

S19,678

Per'd PCT 07 JAN 2005

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年1月22日 (22.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/007758 A1(51) 国際特許分類7:
C12Q 1/02, C12N
15/09, A61K 45/00, G01N 33/53, 33/566

[JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 宇波明 (UNAMI,Akira) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 能登貴久 (NOTO,Takahisa) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008621

(74) 代理人: 田伏英治 (TABUSHI,Eiji); 〒532-8514 大阪府 大阪市 淀川区加島2丁目1番6号 藤沢薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2003年7月7日 (07.07.2003)

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-203901 2002年7月12日 (12.07.2002) JP

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 Osaka (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤村高穂 (FUJIMURA,Takao) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 森泰亮 (MORI,Hiroaki) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 義澤克彦 (YOSHIZAWA,Katsuhiko) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 高田葉子 (TAKADA,Yoko) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 荒森一朗 (ARAMORI,Ichiro) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府 大阪市 中央区道修町3丁目4番7号 藤沢薬品工業株式会社内 Osaka (JP). 松岡秀明 (MATSUOKA,Hideaki)

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドノート」を参照。

(54) Title: NOVEL METHOD OF SELECTING IMMUNOSUPPRESSANT HAVING LITTLE THROMBOCYTOPENIC EFFECT

A1

(54) 発明の名称: 血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の新規選択方法

WO 2004/007758

(57) Abstract: A novel method of selecting an immunosuppressant having little thrombocytopenic effect. Namely, a method of conveniently selecting a compound showing a potent immunosuppressive effect with little thrombocytopenic side effect which comprises measuring the IL-2 transcriptional regulation activity of test cells having an IL-2 reporter gene transferred thereto in the coexistence of a test substance, on the other hand, measuring the GATA-1 transcriptional regulation activity of test cells having a GATA-1 reporter gene transferred thereto in the coexistence of the test substance, and then comparing the transcriptional regulation activities of both test cells to each other.

(57) 要約: 本発明は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の新規選択方法に関する。本発明は、IL-2レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させて当該試験用細胞におけるIL-2転写抑制活性を測定し、一方、GATA-1レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共存させて当該試験用細胞におけるGATA-1転写抑制活性を測定し、両者の転写抑制活性を比較することにより、強い免疫抑制活性を示しながら、血小板減少の副作用が少ない化合物を簡便に選択する方法を提供した。

明細書

血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の新規選択方法

5 技術分野

本発明は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の新規選択方法に関する。

背景技術

今日、臓器移植後の急性拒絶反応を抑制する為に臨床現場で広く用いられている
10 主要な免疫抑制剤であるシクロスボリン A (Cyclosporin A, CsA) 及び タクロリ
ムス (FK506) は、それぞれに特異的なイミュノフィリン (immunophilins: 例え
CsA の場合には cyclophilin, FK506 の場合は、FKBP12) との結合を通じて、 Ca^{2+} /
カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼであるカルシニューリンの活性
を阻害する。その結果、NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cell) の脱リン酸
15 化反応が阻害されることによって、NF-AT の核内移行が阻害され、IL-2 遺伝子の
転写活性が抑制されることが知られている。このような作用メカニズムの研究から、
活性化された T 細胞において IL-2 遺伝子の転写レベルでの発現が特異的に抑制さ
れることが、臓器移植片の拒絶を抑制し、様々な自己免疫疾患等への治療効果を示
す上で、極めて重要であることが明らかになっている。

20 ところで、ヒストンの脱アセチル化を触媒する一群のヒストン脱アセチル化酵素
(histone deacetylase, 以下 HDAC と称す) は、細胞核内で、ヒストンアセチル化
酵素と競合的に働き、クロマチン構造の変換を通じて、様々な遺伝子の発現レベル
を制御していることが知られている。これまでの精力的なスクリーニングから
HDAC 阻害活性を示す化合物が数多く得られているが、それらの中には顕著な IL-2
25 の产生阻害活性を示す化合物が含まれおり (I. Takahashi et al., (1995) The
Journal of Antibiotics 49, 453-457)、シクロスボリン A やタクロリムスを補完
する免疫抑制剤の候補として注目されている。実際、このようにして選択された化
合物の中にはインビボ (in vivo) において優れた免疫抑制作用を示すものが見出
されている。例えば、W000/08048 に開示されているように、FR225497 は、その強

力な免疫抑制作用によって、臓器移植片拒絶 (organ transplant rejection), 自己免疫疾患 (autoimmune diseases) の治療剤や予防剤として優れた効果を示すことが見出されているが、それに加えて、遺伝子発現の異常によって発症すると考えられている他の数多くの疾患の治療剤や予防剤としての有用性も示唆されている。

5 それらの疾患の中には、例えば、炎症性疾患 (inflammatory disorders), 糖尿病 (diabetes), 糖尿病性合併症 (diabetic complications), ホモ接合型サラセミア (homozygous thalassemia), 繊維症 (fibrosis), 肝硬変 (cirrhosis), 急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukaemia, APL), 原虫感染症 (protozoal infection), 癌 (tumor) などが含まれる。 しかしながら、このような有用性に 10 もかかわらず、これらの HDAC 阻害活性を示す化合物の多くは、生体に投与した場合に、重篤な血小板減少の副作用を生じやすいという問題点があり、実際の治療薬としての利用を困難にしていた。

免疫抑制活性を示す HDAC 阻害剤の多くが血小板減少の副作用を生じやすい原因 15 については、現在のところ、まだ十分に解明されているわけではない。しかしながら、本発明者らは、鋭意研究する中で、HDAC 活性を阻害する化合物の多くが GATA-1 (GATA-1 binding protein, GF-1, NF-E1, あるいは Eryf 1 とも呼ばれている) 遺伝子の転写活性をも阻害していることを見出した。

20 GATA-1 は、造血系遺伝子の転写制御領域に特徴的に存在する (A/T) GATA (A/G) コンセンサス配列を認識する DNA 結合蛋白質である。この GATA モチーフ配列は、各種グロビン遺伝子のエンハンサー領域, β -グロビン遺伝子のローカス制御領域 (locus control regions, LCRs), T 細胞受容体 α -鎖, δ -鎖遺伝子のエンハンサー領域などの様々な制御領域やプロモータで見出されている。また、GATA-1 mRNA 25 は、成熟赤血球細胞・マスト細胞・巨核球などで高発現しており、多機能性前駆細胞や若齢マウスの精巣にもわずかに発現が見られる。

GATA-1 蛋白質には、C4 型 Zn フィンガー領域 (C4-type zinc finger) が 2 個所存在する。これらのうち特に N-末端側に存在する Zn フィンガーは、Fog-1

(Friend of GATA-1) などの転写共役因子との相互作用を通して、赤血球や巨核球の成熟に必須の機能を担っていることが知られている。例えば、ヒト GATA-1 遺伝子は X 染色体上に存在しているが、X 染色体に連関した遺伝性の造血不全性貧血患者や血小板減少症患者の一部には、この Zn フィンガーに対応する部位に V205M 変異や D218G 変異が見られることが報告されている (K. E. Nichols et al., (2000) *Nat. Genet.* 24, 266-270; K. Freson et al., (2001) *Blood* 98, 85-92)。Fog-1 は、それ自身 9 個所の Zn フィンガーを有しており、おそらくこれらを介して、プロモーター領域に結合した GATA-1 と他の核内因子との結合を媒介する役割を担っていると推定される。

10

GATA-1 遺伝子自身のプロモーターについては、これまでに、I E プロモーター及び I T プロモーターの少なくとも 2 種類が見出されている。それに応じて、この遺伝子の第 1 エクソンも 2 種類存在する。このうち、精巣の Sertoli 細胞では I T プロモーターが特異的に働き、造血系細胞では、主として I E プロモーターが働いていると言われている。しかしながら、I T プロモーターは、Primary Erythroid Cells の分化段階にも働くと報告されており (A. M. Vannucchi et al., (1999) *Journal of Cellular Physiology* 180, 390-401)、上記 2 種類のプロモーターが生体内でどのように使い分けられているかについて、その詳細はまだ十分に解明されている訳ではない。

20

造血系細胞での転写制御には、その転写開始点から上流約 0.7 kb までの範囲内に存在すると予想される I E プロモーター配列が重要と考えられる。この領域には、GATA モチーフや CACC モチーフに一致する配列が含まれているが、内部に存在する制御配列の詳細については、ヒト配列そのものを直接用いた解析が、あまり報告されていない為、まだ不明の部分が多い。しかし、この領域単独では微弱な転写活性を示すのみであり、少なくとも巨核球系細胞での発現には、さらに上流約 3.8 kb から 3.5 kb 付近に存在する約 317 塩基対の HSI 領域 (DNase I 高感受性領域) が必要であると考えられている (P. Vyas et al., (1999) *Development* 126, 2799-2811; S. Nishimura et al., (2000) *Molecular and Cellular Biology* 20,

713-723)。このHSI領域には、GATAモチーフ配列とE-boxモチーフ配列が近接したGATA-E-boxモチーフが存在しており、GATA-1, GATA-2などのGATA因子がSCL/tal-1, E2A (TCF3, transcription factor 3), LMO-2 (LIM only protein 2)やLdb-1 (LIM domain bainding factor-1)などの核内蛋白質と複合体を形成して相互作用している可能性が示唆される。HSI領域の配列の中には、ヒトとマウスの間で、5かなりよく保存された領域が存在する。

GATA-1遺伝子を通常の方法でノックアウトしたマウスは、1次造血細胞の形成障害から胚発生の段階で致死的となる (Y. Fujiwara et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12355-12358)。一方、巨核球系列のGATA-1遺伝子発現だけを選択的にノックアウトさせたマウスを作製することは可能であり、このようなマウスにおいては、血小板数が激減し、巨核球系細胞の正常な成熟も見られないことが判明している (R. A. Shivdasani et al., (1997) The EMBO Journal 16, 3965-3973)。

15 発明の開示

これまでに、HDAC阻害活性を示す化合物は、生体に投与した場合に優れた免疫抑制作用を示す化合物が数多く知られているが、それらの化合物は、同時に重篤な血小板減少作用も示す為に、臨床への応用が難しく、必ずしも満足できるものではなかった。従って、これらの候補化合物の中から、さらに血小板減少作用を示さない化合物のみをイン・ビトロ (in vitro) でスクリーニングする為の優れた方法を提供することが強く求められており、本発明はこのような課題の解決をその目的とするものである。

これまでの研究から、GATA-1遺伝子産物が、赤血球系や巨核球系の細胞分化や成熟に重要な役割を果たしていることは、すでに判明している (X. Tang et al., (2001) : CMLS, Cell. Mol. Lif Sci. 58, 2008-2017)。しかしながら、巨核球系列の細胞分化や成熟には、GATA-1以外にも他の多くの因子の関与が示唆されており、HDAC阻害剤の多くで見られる血小板減少作用がGATA-1そのものの機能阻害を介したものであるかどうかについては、今までのところ、まったく不明であった。本発明者等の今回の研究は、様々なHDAC阻害剤の作用を比較検討することによって、

それら薬剤の投与によって生じる血小板減少作用が、GATA-1 遺伝子の転写抑制によってもたらされるものであることを初めて明らかにしたものである。HDAC 阻害剤の多くで見られる血小板減少作用の原因を探る為に、本発明者らは、巨核球で発現している遺伝子の中から、HDAC 阻害薬で GATA-1 と同様のパターンで転写が抑制されるヒト由来の遺伝子を GeneChip[®] (Affymetrix 社) を用いて選別してグループ化し、それらの遺伝子群に共通な転写因子の探索を行なった。そして、GATA-1 遺伝子と同様のパターンによって HDAC 阻害薬により転写抑制される遺伝子 45 種類の中から、さらに、血球分化に関わる機能を有すると想定される転写因子の候補遺伝子あるいは巨核球マーカー遺伝子と想定される候補遺伝子 10 遺伝子を得た。次に、これらの各遺伝子の転写制御領域と GATA-1 遺伝子の転写制御領域において共通に存在する転写因子の結合配列がないかどうか詳細に調べてみたところ、GATA-1 自身が認識する応答配列 (GATA 配列) 以外に STAT3、C/EBP β 、HSF1 が認識する応答配列がほぼ共通して存在することが明らかになった。しかしながら、上記の GATA-1 以外の各転写因子が認識する応答配列で制御されるレポーター遺伝子発現系を構築して、HDAC 阻害薬の効果を調べてみたところ、いずれの場合も、レポーター遺伝子の転写は HDAC 阻害薬により抑制されないことが判明した。

さらに、本発明者は、GATA-1 遺伝子プロモーター内に存在している GATA 配列内に変異を導入して GATA-1 自身が認識する応答配列を消失させたプロモーターを人工的に構築し、レポーター遺伝子発現系に組み込んで細胞に導入し調べてみたところ、レポーター遺伝子の転写は、少なくとも 3 種類の HDAC 阻害薬を添加しても、抑制されないことが判明した。これらの結果は、HDAC 阻害薬による GATA-1 遺伝子の発現抑制は、GATA-1 遺伝子プロモーター内の GATA 配列を介した転写因子による転写活性化機能が阻害されることにより生じていることを示している。すなわち、GATA-1 因子そのものは、GATA 配列を介した転写活性化機能を有しているので、これらの結果は、HDAC 阻害薬が GATA-1 因子による転写活性化機能を阻害することにより、血小板減少の副作用を生じている可能性を強く示唆している。

ところで、本発明者らは、数多くの免疫抑制作用を示す HDAC 阻害剤について、ラット心移植モデルでの有効用量について鋭意研究する中で、ラット心移植モデルでの免疫抑制剤としての有効性が、IL-2 遺伝子の発現抑制と深く関わっているこ

5 と/or 6 に思い至り、この事実を確認する為に、IL-2 遺伝子の転写制御領域を用いたレポーターアッセイ系の構築を行った。このレポーター遺伝子を含む DNA 構築物 (DNA construct) を、活性化した T 細胞由来の細胞株に導入して、様々な被験化合物を添加した際のレポータ活性の変化を測定し比較した。この結果、ラット心移植モデルでの免疫抑制剤としての有効性が、IL-2 転写抑制作用とよく相関することを見出した。

10 さらに、本発明者らは、上述のように数多くの HDAC 阻害剤の重篤な副作用である血小板減少作用については、GATA-1 遺伝子そのものの発現抑制が深く関わっていることに思い至り、この事実を確認する為に、GATA-1 遺伝子の転写制御領域を用いたレポーターアッセイ系の構築を行った。これらのレポーター遺伝子を含む DNA 構築物を、巨核球系列由来の細胞株に導入し、これに様々な被験化合物を添加した際のレポータ活性の変化を測定し比較した。その結果、血小板抑制作用の強い化合物ほど GATA-1 遺伝子の転写を強く抑制する傾向にあることを見出した。

15 そこで、本発明者は、GATA-1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における GATA-1 転写抑制活性を測定することによる、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法を見出した。

20 さらに、本発明者は、上記の 2 種類の細胞を用いたレポーターアッセイ系を併用することにより、強力な IL-2 転写抑制活性を示し、なおかつ GATA-1 転写抑制活性の弱い化合物を選択することにより、免疫抑制活性を示し、血小板減少作用の副作用が少ない化合物を迅速に選択する為の方法を発明した。

25 本発明は、IL-2 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共に存させて当該試験用細胞における IL-2 転写抑制活性を測定し、一方、GATA-1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共に存させて当該試験用細胞における GATA-1 転写抑制活性を測定し、両者の転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

さらに、本発明は、IL-2 蛋白の発現量を測定し、GATA-1 蛋白の発現量を測定し、

両者の発現量を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

さらに、本発明は、IL-2 レポーター遺伝子を含むDNA構築物、GATA-1 レポーター遺伝子を含むDNA構築物、T 細胞系列の試験用細胞、巨核球細胞系列の試験用細胞で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キットに関する。

さらに、本発明は、IL-2 転写抑制活性として(IL-2 IC50)値を測定し、GATA-1 転写抑制活性として(GATA-1 IC50) 値を測定し、その両者を比較して、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50) 値が 5 以上を示すものを選択することにより得られた化合物を有効成分として含む炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髓球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療剤に関する。

15

すなわち、本発明は、以下の発明に関する。

《1》以下の(1)及び(2)からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

(1) 免疫抑制活性を有する化合物を選択する、

20 (2) (1)で選択した化合物から、さらに GATA-1 転写抑制活性の少ない化合物を選択する、

《2》以下の(1)から(3)からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

(1) 被験化合物の免疫抑制活性を測定する、

25 (2) 被験化合物の GATA-1 転写抑制活性を測定する、

(3) (1)で求めた免疫抑制活性と(2)で求めた GATA-1 転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する、

《3》以下の(1)から(3)からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

(1) 試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における IL-2 転写抑制活性を測定する、

(2) 試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における GATA-1 転写抑制活性を測定する、

5 (3) (1)で求めた IL-2 転写抑制活性と (2) で求めた GATA-1 転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する、

《4》以下の (1) から (3) からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

10 (1) IL-2 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における IL-2 転写抑制活性を測定する、

(2) GATA-1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における GATA-1 転写抑制活性を測定する、

(3) (1)で求めた IL-2 転写抑制活性と (2) で求めた GATA-1 転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する、

15 《5》 《4》において、IL-2 転写抑制活性として (IL-2 IC50) 値を測定し、GATA-1 転写抑制活性として (GATA-1 IC50) 値を測定し、両者を比較することによる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

《6》 《5》において、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50) 値が 5 以上の化合物を選択することによる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

20 《7》 GATA-1 レポーター遺伝子が、ヒト GATA-1 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子から構成されるものである《4》－《6》のいずれかに記載の方法。

《8》 GATA-1 レポーター遺伝子が、ヒト GATA-1 遺伝子の転写開始点上流の-3769 から -3133 の領域配列及び転写開始点近傍の-789 から +30 の領域配列を含むものである《4》－《7》に記載の方法。

25 《9》 IL-2 レポーター遺伝子がヒト IL-2 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子から構成されるものである《4》－《8》のいずれかに記載の方法。

《10》 IL-2 レポーター遺伝子が、ヒト IL-2 遺伝子の転写開始点近傍の-378 から +54 の領域配列を含むものである《4》－《9》のいずれかに記載の方法。

《11》 GATA-1 レポーター遺伝子を導入する試験用細胞がヒト巨核球系列の細

胞株である《4》－《10》のいずれかに記載の方法。

《12》 IL-2 レポーター遺伝子を導入する試験用細胞が Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Ionomycin 及び Anti CD28 antibody で刺激されたヒトT細胞由来の細胞株であり、GATA-1 レポーター遺伝子を導入する試験用細胞がヒト巨核球系

5 細胞株である《4》－《11》のいずれかに記載の方法。

《13》 ヒトT細胞由来の細胞株が Jurkat 細胞である請求項12に記載の方
法。

《14》 ヒト巨核球系列の細胞株が HEL 細胞である《11》に記載の方法。

《15》 ヒト巨核球系列の細胞株が HEL 細胞である《12》に記載の方法。

10 《16》 レポーター遺伝子がホタルルシフェラーゼ遺伝子である《4》－《15》
のいずれかに記載の方法。

《17》 被験物質がHDAC阻害剤であるところの《1》－《16》のいずれか
に記載の選択方法。

15 《18》 GATA-1 蛋白の発現量を測定することによる、血小板減少作用の少ない
免疫抑制剤の選択方法。

《19》 次の(1)から(3)からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選
択方法。

(1) IL-2 蛋白の発現量を測定する、

(2) GATA-1 蛋白の発現量を測定する、

20 (3) 両者の発現量を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を
選択する、

《20》 以下の(1)(2)で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選
択の為の測定用キット。

(1) GATA-1 レポーター遺伝子を含むDNA構築物、

25 (2) 巨核球細胞系列の試験用細胞

《21》 以下の(1)から(4)で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制
剤選択の為の測定用キット。

(1) IL-2 レポーター遺伝子を含むDNA構築物、

(2) GATA-1 レポーター遺伝子を含むDNA構築物、

(3) T細胞系列の試験用細胞、

(4) 巨核球細胞系列の試験用細胞

《22》 《17》記載の方法により選択された血小板減少作用が少ないH D A C 阻害剤。

5 《23》 《1》－《16》のいずれかに記載の選択方法により選択された血小板減少作用の少ない免疫抑制剤。

《24》 《22》に記載のH D A C 阻害剤を有効成分として含む、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療の為の免疫抑制剤。

10 《25》 《23》に記載の免疫抑制剤を有効成分として含む炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療剤。

15 《26》 《22》に記載のH D A C 阻害剤を有効成分として含む血小板減少作用が少ない免疫抑制剤を投与することによる、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療方法。

20 《27》 《23》に記載の免疫抑制剤を有効成分として含む血小板減少作用が少ない免疫抑制剤を投与することによる炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療方法。

《28》 炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療剤製造の為の《22》に記載のH D A C 阻害剤の使用。

25 《29》 炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療剤製造の為の《23》に記載の免疫抑制剤の使用。

以下に、本発明について詳細に説明する。

本発明は、IL-2 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共にさせて当該試験用細胞における IL-2 転写抑制活性を測定し、一方、GATA-1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共にさせて当該試験用細胞における GATA-1 転写抑制活性を測定し、両者の転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

上記発明の『IL-2 レポーター遺伝子』とは、IL-2 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子とを人工的に連結させた DNA 構築物 (DNA construct) を言う。IL-2 遺伝子の転写制御領域としては、例えば、ヒト IL-2 遺伝子 (GenBank Accession Number: X00695, Locus code: HSIL05) の転写開始点付近とその上流領域を含む配列が用いられる。本発明の目的に必須な転写制御領域の範囲としては、単に転写活性を保持しているのみならず、活性型 T 細胞における天然の IL-2 遺伝子の転写制御様式を実質的に反映したものであることが望ましい。実際に、ヒト IL-2 遺伝子に関しては、転写開始点の上流側に位置する約 275 塩基対の領域が存在すれば、ヒト T-リンパ芽球由来の細胞株である Jurkat (JCRB0062, Japanese Collection of Research Bioresources) において、天然の IL-2 遺伝子の転写制御様式を実質的に反映したプロモーターとして機能することが報告されている (D. B. Durand et al., (1987) J. Exp. Med. 165, 395-407)。これまでの研究から、この領域には、NF-AT, OCT-1 (Octamer-binding transcription factor-1), NF-κB, AP-1, CD28RC (CD28 responsive element binding complex), ZEB (TCF8, NIL-2-A zinc finger protein) などの蛋白の結合部位が配置していることがわかっている。従って、そのような蛋白の結合に必須な領域を含んだものであれば、IL-2 レポーター遺伝子の構築に用いる領域としては、どのような長さの配列でもかまわないと、たとえば、配列表 9 に記載の 434 塩基対の領域 (上記 GenBank 配列において、主要な転写開始点を +1 とした場合の -378 から +54 に相当する領域) を用いることができる。

ヒトに対して効果的な免疫抑制剤のスクリーニング系を構成する為には、ヒト由来の IL-2 遺伝子の転写制御領域を用いることが望ましい。また、マウスやラットなどの動物モデルで有効な化合物をスクリーニングする為には、上記ヒト配列に換

えて、それぞれの動物由来の IL-2 遺伝子の転写制御領域を用いれば良く、そのような DNA 構築物は、通常の実験技術を有する当業者によって、容易に構築可能である。

5 また、上記発明の『GATA-1 レポーター遺伝子』とは、GATA-1 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子とを人工的に連結させた DNA 構築物を言う。GATA-1 遺伝子の転写制御領域としては、ヒト GATA-1 遺伝子 (GenBank Accession Number: AF196971) の I E プロモーター領域及びその上流約 3. 5 k b 付近に離れて存在する HSI 領域 (DNase I 高感受性領域) の両方を含む DNA 断片が用いられる。本発明の目的に必須な転写制御領域の範囲としては、単に転写活性を保持しているのみならず、巨核球系細胞における天然の GATA-1 遺伝子の転写制御様式を実質的に反映したものであることが望ましい。

15 先述のように、GATA-1 遺伝子のプロモーターについては、I E プロモーター及び I T プロモーターの少なくとも 2 種類が存在することが知られている。このうち、HDAC 阻害剤による血小板減少作用との関連においては、巨核球系細胞における転写制御と密接に関連していることが判明している I E プロモーターの機能が重要と推定され、今回の発明ではその制御領域を利用している。

20 I E プロモーターによる転写制御には、転写開始点のすぐ上流約 0. 7 k b 内に存在する配列とさらに上流に存在する HSI 領域 (DNase I 高感受性領域) の両方が重要である。HSI 領域の 5' 側には、2 個の CACC site が存在し、それから約 50 塩基対離れて、GATA 結合部位 (GATA binding site) と E-box モチーフが約 10 塩基対離れて隣り合っている。このうちの GATA 結合部位を壊すような変異を導入すると、赤血球や巨核球特異的な発現が見られなくなることが知られている (P. Vyas et al., (1999) Development 126, 2799-2811)。また、この GATA-E-box モチーフのさらに 3' 側には、特徴的なパリンドローム配列である C T G T G G C C A C A G 配列及び、G C に富む領域が存在する。G C に富む領域の中には、転写因子の E TS の結合部位に見られる G G A A 配列が存在する。これらの配列を含む GATA-1

HSI 領域のうち、5' 側の C A C C site を欠損させても、赤血球や巨核球特異的な発現が見られるが、GATA-E-box motif まで欠損させると、発現は消失する。3' 側については、最大でも E-box の下流約 250 塩基対までを含めば、エンハンサーとして機能することが報告されている。従って、以上のような必須の配列部位をすべて含んでいるならば、実際にはどのような長さの配列でもかまわないが、たとえば、ヒト GATA-1 遺伝子の I E プロモーターによる転写開始点近傍（-789 から +30：転写開始点を+1 とする）819 塩基対を含む領域と転写開始点上流の HIS 領域として 637 塩基対（-3769 から-3133）を含む領域を人工的に連結させたものを用いることができる。

10

GATA-E-box motif 等の必須な配列部位については、通常の組換えDNA実験の手法により、それらの必須配列を複数個タンデムに重複させた人工的なDNA構築物を作製することが可能である。このような人工的構築物を天然の配列と入れ換えて用いることにより、当該転写制御領域の転写誘導活性を増強させることができる場合がある。

また、様々な HDAC 阻害剤の GATA-1 転写抑制活性とマウスやラットなどの動物モデルでの血小板減少作用との相関を確認する為には、上記ヒト配列に換えて、動物由来の GATA-1 遺伝子の転写制御領域を用いて、同様のDNA構築物を作製すればよ

く、そのようなDNA構築物の作製は、通常の実験技術を有する当業者によって、容易に実施可能である。

本発明に用いられる『レポーター遺伝子』とは、遺伝子発現の目印となる特異的蛋白質をコードする構造遺伝子領域と下流の非翻訳領域 (3'-non coding region) から構成され、構造遺伝子上流側に本来存在する転写制御領域をすべて欠失したものを言う。遺伝子発現の目印となる特異的蛋白質をコードする構造遺伝子領域については、外来遺伝子断片と人工的に連結させて細胞に導入することにより、当該外来遺伝子断片に含まれる転写制御領域からの遺伝子発現をそのレポーター遺伝子がコードする目印となる蛋白質の機能から容易に測定可能なものであれば、どの

ようなものでもかまわない。より好ましくは、当該目印となる蛋白質は、通常の哺乳類細胞中で安定的に存在し、同様の活性を示す内在的な蛋白質が当該細胞中に存在しないか、仮に存在しても容易に区別して測定可能なものであることが望ましい。また、より好ましくは、当該目印となる蛋白質をコードする mRNA は、細胞内で安定的に存在するものであることが望ましい。また、当該目印となる蛋白質の基質は、活性を測定するに際して、新たに添加する必要がないものであるか、あるいは添加を必要とするも、細胞内に容易に十分量取り込まれ得るものであることが望ましい。また、これらによって構成される測定系は、広範囲の直線性と高感度性を兼ね備えたものであることが望ましい。ホタル(firefly)由来のルシフェラーゼ遺伝子、ウミシイタケ (Renilla) 由来のルシフェラーゼ遺伝子、アルカリリフォスファターゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、緑色蛍光蛋白質(GFP, Green Fluorescent Protein) 遺伝子、増強型緑色蛍光蛋白質 (EGFP, Enhanced Green Fluorescent Protein) 遺伝子、 β -グルクロニダーゼ (β -Glucuronidase) 遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase, HRP) 遺伝子などを用いることが可能である。より好ましくは、ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子を用いればよい。ホタル由来のルシフェラーゼ遺伝子については、改良型のルシフェラーゼ遺伝子(luc+)を用いることにより、測定系の検出感度を上げることができる。構造遺伝子下流の非翻訳領域については、例えば SV40 ウイルスゲノム後期遺伝子由来の配列を用いることができる。

上述の IL-2 レポーター遺伝子及び GATA-1 レポーター遺伝子は、それぞれクローニングベクターに連結し、大腸菌を宿主として増幅させる。その際のクローニングベクターとしては、大腸菌で増幅可能な複製開始点と選択マーカーをもつたものであれば、特に限定されないが、例えばアンピシリン耐性マーカーと改良型のルシフェラーゼ構造遺伝子 (luc+) をコードした pGL3-Basic (Promega Corporation)などを用いれば、上述の DNA 構築物を容易に作製できる。その後、増幅したベクターを動物細胞に一過的に導入して、レポーター活性を測定すればよい。

IL-2 レポーター遺伝子やGATA-1 レポーター遺伝子を含む DNA 構築物を動物細胞へ導入する方法としては、通常のりん酸カルシウム法・リポソーム法・リポフェクチン法や エレクトロポーレーション法(electroporation 法、電気穿孔法)などのいずれかによる形質転換方法を用いればよく、特に限定されない。より好ましくは、
5 エレクトロポーレーション法を用いればよい。

免疫抑制活性を示す化合物を選択する為の系として IL-2 レポーター遺伝子を導入する『試験用細胞』については、その宿主細胞として Jurkat 細胞 (JCRB0062, 10 Japanese Collection of Research Bioresources) を用いることができるが、T 細胞由来の細胞株であれば、他の細胞株を用いることも可能である。ところで、シクロスボリン A, タクロリムス等の免疫抑制剤の作用メカニズムの研究から、活性化された T 細胞において IL-2 の発現が抑制されることが、これらの薬剤による臓器移植後の急性拒絶反応の抑制効果と強く相関することが知られている。従って、被 15 験物質の免疫抑制作用を IL-2 レポーター遺伝子を用いて評価する系を構成するに際しては、試験用細胞としては、休止時ではなく活性化時のヒト T 細胞の状態を実質的に反映した細胞を用いることが必要である。T 細胞では、標的細胞上の CD4/CD8 と抗原ペプチドを提示した MHC 複合体を認識する TCR/CD3 複合体を介する第 1 シグナルと、標的細胞上の CD80 または CD86 を認識する CD28 を介する第 2 シ 20 グナルの 2 種類が知られており、T 細胞が活性化されている為には、上記 2 種類のシグナルの両方を生じるような刺激が同時に与えられているか、あるいはそれらをバイパスする刺激が与えられている必要がある。第 1 シグナルによって生じる非特異的な T 細胞の活性化には、一群の蛋白質のリン酸化や細胞内カルシウム濃度の上昇を伴うことが知られているが、その効果は、経験上、12-Myristate 13-Acetate な 25 どのフォルボールエステルやイオノマイシン(Ionomycin)を添加することによって代替され得る。さらにこれに加えて、上記第 2 シグナルへの刺激として、Anti CD28 antibody が用いられる。従って、本発明に用いられる活性化された試験用細胞は、上記の宿主細胞を、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Ionomycin 及び Anti CD28 antibody で同時に刺激することによって得ることができる。

同様に、血小板減少作用の少ない化合物を選択するに際しては、GATA-1 レポーター遺伝子を導入する『試験用細胞』としては、巨核球系列の細胞の状態を実質的に反映した細胞株を宿主細胞に用いる必要がある。巨核球系列の細胞株であれば、
5 特に限定されないが、例えば、ヒト由来の HEL 細胞 (JCRB0062, Japanese Collection of Research Bioresources) を用いることができる。

上記本発明の『被験物質』とは、本発明の方法による測定系にかけられる候補物質であれば、特に限定されず、低分子有機化合物、低分子無機化合物、蛋白質や核酸を含む高分子化合物、糖類等のあらゆる化合物を含み、またそれらの混合液、天然物や合成品、動植物や菌類、藻類、微生物からの抽出液のすべてを含む。
10

上記本発明の『試験用細胞を被験物質と共に存』させる方法としては、エレクトロポーリーション法により試験用細胞に IL-2 レポーター遺伝子または GATA-1 レポーター遺伝子を導入する前か後に、その培養液に被験物質を添加すれば良い。より好ましくは、IL-2 レポーター遺伝子または GATA-1 レポーター遺伝子を導入して約 1
15 – 24 時間、より好ましくは約 3–12 時間後に、その培養液に被験物質を添加して、さらに 1–24 時間、より好ましくは、8–12 時間程度培養すれば良い。

20 上記本発明の『IL-2 転写抑制活性』は、上記の IL-2 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞において、被験物質を共存させない場合のレポーター遺伝子産物の活性を測定して基準とし、被験物質を共存させた場合のレポーター遺伝子産物の活性と比較することにより求めることができる。レポーター遺伝子産物が十分安定な蛋白質である場合には、この遺伝子産物の活性は、IL-2 遺伝子転写活性にほぼ比例
25 することが期待される。

同様にして、上記本発明の『GATA-1 転写抑制活性』は、上記の GATA-1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞において、被験物質を共存させない場合のレポーター遺伝子産物の活性を測定して基準とし、被験物質を共存させた場合のレポーター

遺伝子産物の活性と比較することにより求めることができる。

以上述べた方法により、IL-2 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞（例えば Jarkat 細胞）と GATA-1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞（例えば HEL 細胞）のそれぞれを構築することができる。そして、これらの細胞のそれぞれを様々な被験物質と共に存させ、試験用細胞における IL-2 転写抑制活性と GATA-1 転写抑制活性の強さを、それぞれのレポーター遺伝子の発現を指標として検出し測定することができる。血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する為には、そのような試験用細胞系において IL-2 の発現を特異的に抑えるが GATA-1 の発現を抑制しない物質を選択すればよい。

実際に臨床でより有効な化合物をスクリーニングする為には、それぞれの被検物質の血小板減少作用を、該被検物質の免疫抑制作用の強さとの兼ね合いで評価することが望ましく、すなわち、該被検物質を生体に投与した際にある一定の免疫抑制作用を示す有効用量において、どの程度の血小板減少作用を生じるかが評価の基準となる。これは、より具体的には、以下のように計算される。すなわち、上述の 2 組のレポーター遺伝子発現系を用いて、それぞれのルシフェラーゼ発現量を定量する。その際、本発明の『IL-2 IC50 値』は、被検物質を全く添加していない場合の IL-2 レポーター遺伝子の発現量を 100% とし、当該 IL-2 レポーター遺伝子の発現量を 50% 抑制する被検物質の添加濃度を示しており、薬物用量作用曲線から容易に算出される。この値は、生体において、ある一定の免疫抑制作用を示す有効用量、すなわち例えば免疫抑制作用を示す最小有効用量に相関すると予想される。同様にして、本発明の『GATA-1 IC50 値』は、被検物質を全く添加していない場合の GATA-1 レポーター遺伝子の発現量を 100% とし、当該 GATA-1 レポーター遺伝子の発現量を 50% 抑制する被検物質の添加濃度を示しており、薬物用量作用曲線から容易に算出される。このようにして算出された GATA-1 IC50 値を IL-2 IC50 値で除した値 ((GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50) 値) を求めると、この (GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50) 値は、それぞれの被検物質を、ある一定の強さの免疫抑制作用を示す用量だけ生体に投与した際に、該用量の該被検物質が示す血小板減少作用の程度に相関すると予想される。すなわち、この (GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50) 値は、例えば、そ

5 れぞれの被検物質を生体に投与した際に免疫抑制作用が見られる最小有効用量における血小板減少作用の強度に相関すると予想される。実際に、レポーター・アッセイのデータを基にして、上述のようにして求めた各被検物質の(GATA-1 IC₅₀) / (IL-2 IC₅₀) 値は、それぞれの被検物質をラット心移植モデルに投与した際に免疫抑制活性が見られる最小有効用量での血小板減少率と良く相関することが確かめられている。そして、(GATA-1 IC₅₀) / (IL-2 IC₅₀) 値が、例えば 5 以上の化合物では、当該ラット心移植モデルにおいて免疫抑制効果を示す最小有効用量を投与した場合の血小板減少率が 30% 以下に抑えられることが判明している。

10 ところで、上記のように、『GATA-1 転写抑制活性』と『IL-2 転写抑制活性』は、それぞれ人工的に構築した GATA-1 レポーター遺伝子あるいは IL-2 レポーター遺伝子を細胞に導入して、レポーター遺伝子産物の活性を指標として求めることが望ましいが、前述の転写制御領域をすべて含んだ GATA-1 遺伝子や IL-2 遺伝子をそのまま細胞に導入して RT-PCR 法や DNA microarray 等の方法により GATA-1 mRNA や IL-2 mRNA を定量することにより、その転写活性を測定することも可能である。また、15 使用する細胞系によっては、細胞に内在する本来の GATA-1 遺伝子や IL-2 遺伝子の発現を RT-PCR や DNA microarray 等の方法によって直接モニターすることによっても、可能な場合がある。通常の実験技術を有する当業者ならば、そのような方法を適宜工夫してアッセイ系を構成することは容易である。

20

また、本発明は、IL-2 蛋白の発現量を測定し、GATA-1 蛋白の発現量を測定し、両者の発現量を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する方法に関する。

25 上記発明の『IL-2 蛋白の発現量』は、IL-2 レポーター遺伝子を導入しない前記試験用細胞の抽出液を被検物質で処理し、IL-2 蛋白の発現量を、抗 IL-2 抗体及び、標識化された 2 次抗体を用いて測定することができる。その手法としては、放射性同位元素免疫測定法 (RIA 法)、ELISA 法 (E. Engvall et al., (1980): Methods in Enzymol., 70, 419-439)、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、凝

集法、オクタロニー (Ouchterlony) 等の、一般の免疫化学的測定法において使用されている種々の方法 (「ハイブリドーマ法とモノクローナル抗体」、株式会社R&Dプランニング発行、第30頁-第53頁、昭和57年3月5日) を利用することができ、当業者であれば、容易に実施可能である。上記手法は種々の観点から適宜選択することができるが、感度、簡便性等の点からはELISA法が好ましい。

上記2次抗体を標識するにあたり使用される標識物質としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、フルオレセインイソシアネート、ローダミン等の蛍光物質、³²P、¹²⁵I等の放射性物質、化学発光物質などが挙げられる。

同様の手法により、上記発明の『GATA-1蛋白の発現量』は、抗GATA-1抗体及び、標識化された2次抗体を用いて測定することができる。

また、本発明は、IL-2レポーター遺伝子を含むDNA構築物、GATA-1レポーター遺伝子を含むDNA構築物、T細胞系列の試験用細胞、巨核球細胞系列の試験用細胞で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キットに関する。

上記発明の『血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット』は、IL-2レポーター遺伝子とGATA-1レポーター遺伝子のそれぞれを導入した試験用細胞を被験物質と共に存させ、試験用細胞におけるIL-2転写抑制活性とGATA-1転写抑制活性の強さを、IL-2レポーター遺伝子とGATA-1レポーター遺伝子の発現を指標として検出し、測定することができればよい。具体的には、以下の(1)から(4)によって構成することができる。

- (1) IL-2レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (2) GATA-1レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (3) T細胞系列の試験用細胞、より好ましくは、Jurkat細胞

(4) 巨核球細胞系列の試験用細胞、より好ましくは、HEL 細胞

上記発明の『DNA構築物』とは、上述の IL-2 レポーター遺伝子または GATA-1 レポーター遺伝子を含むDNAで、クローニングベクターに組込まれたものでも、
5 組込まれないものでもよく、また環状でも線状でもかまわない。

また、本発明は、IL-2 転写抑制活性として(IL-2 IC50)値を測定し、GATA-1 転写抑制活性として(GATA-1 IC50)値を測定し、その両者を比較して、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50)値が5以上を示すものを選択することにより得られた化合物を有効成分として含む炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療方法及び治療剤に関する。

前述の評価方法に基づいて、IL-2 転写抑制活性として(IL-2 IC50)値を測定し、
15 GATA-1 転写抑制活性として(GATA-1 IC50)値を測定し、その両者を比較して、 (GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50)値が5以上を示すものを選択することにより得られた化合物は、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤として臓器移植片拒絶、自己免疫疾患の治療や予防に有用である。そして、遺伝子発現の異常によって発症すると思われる以下のような疾患の治療や予防に有用である。

20 炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、癌

本発明においてこれらを医薬品として用いる場合には、それ自体として医薬品として用いることも可能であるが、公知の製剤学的方法により製剤化して用いることも可能である。例えば、薬理学上許容される担体若しくは媒体、具体的には滅菌水、
25 生理食塩水、植物油、乳化剤、駆濁剤等、製剤に用いられる公知のものと適宜組み合わせた医薬製剤の形態、例えば固体、半固体または液体（例えば錠剤、丸剤、トローチ剤、カプセル剤、坐薬、クリーム剤、軟膏剤、エアロゾル剤、散剤、液剤、乳剤、懸濁剤など）で用いることができる。

患者への投与は、鼻、眼、外部（局所）、直腸、肺（鼻または口内注入）、経口ま

たは非経口（皮下、静脈および筋肉内を含む）投与または吸入に適している。注射剤の投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射等の公知の方法により行なうことができる。

本発明の治療剤の投与量は、所望の治療効果を生じるに足りる量であればよい。

5 当該化合物の治療有効量は、例えば非経口投与による場合には、通常は、1日当たり約0.1～100mg、好ましくは1～16mgを投与することが好ましい。有効な1回投与量は、患者の体重1kg当たり0.001～1mgの範囲、好ましくは0.01～0.16mgの範囲内で選択される。しかしながら、上記の投与量は、処置すべき各個の患者の体重、年齢及び病状、並びに、用いる投与方法等により変わるものである。通常の実験手法を有する当業者であれば、動物実験等のデータを基にして、より適切な投与量を適宜選択することが可能である。

10

図面の簡単な説明

図1は、血中の血小板数 (n=5) が、HDAC阻害薬化合物Bの投与量に依存して減少することを示した図面である。

図2は、脾臓内の巨核球数 (n=5) が、HDAC阻害薬化合物Bの投与量に依存して5增加することを示した図面である。

図3は、GPIIbを内部標準として測定した脾臓内の単位巨核球あたりのGATA-1の発現量 (n=5) が、HDAC阻害薬化合物Bの投与量に依存して抑制されることを示した図面である。

図4は、プラスミッドpGL3 IL-2 Pro43のマップを示す。

10 図5は、プラスミッドpGL3-IE Promoterのマップを示す。

図6は、プラスミッドpGL3-HSI-IE Promoterのマップを示す。

図7は、IL-2レポーター遺伝子におけるルシフェラーゼ活性が、化合物D濃度依存的に阻害されることを示した図面である。

15 図8は、IL-2レポーター遺伝子アッセイ系における細胞増殖が、化合物D濃度非依存的であることを示した図面である。

図9は、GATA-1レポーター遺伝子におけるルシフェラーゼ活性が、化合物D濃度依存的に阻害されることを示した図面である。

図10は、GATA-1レポーター遺伝子アッセイ系における細胞増殖が、化合物D濃度非依存的であることを示した図面である。

20 図11は、HDAC阻害剤によるラットでの免疫抑制作用及び血小板減少作用と細胞レベルでのIL-2びGATA-1転写抑制作用に対する相関を示す。

図12は、2種類のHDAC阻害薬（それぞれ2種類の濃度）がGATA-1遺伝子の転写に及ぼす効果のパターンを示した図面である。

25 図13は、2種類のHDAC阻害薬（それぞれ2種類の濃度）が12,626種類の遺伝子より選ばれた45種類の遺伝子の転写に及ぼす効果のパターンを示しており、これらの遺伝子のHDAC阻害薬による転写抑制のパターンがGATA-1遺伝子の場合と類似していることを示している。

図14(a)は、C/EBP β reporter plasmidで用いられたC/EBP β の結合配列を示している。

図14(b)は、HSE reporter plasmidで用いられたHSF1(またはHSF2)の結合配列を示している。

図14(c)は、pSTAT3 reporter plasmidで用いられたSTAT3の結合配列を示している。

5 図15は、IE promoter (mutant)の配列を示す。変異導入箇所は、大文字で表わされている。

図16は、HSI (mutant)領域の配列を示す。変異導入箇所は、大文字で表わされている。

10 発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されない。また本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

15 実施例1 HDAC阻害薬投与による血小板減少作用の確認

8週齢の雄性LewisラットにHDAC阻害薬化合物Bを7日間経口投与した。群構成は投与量0, 3.2mg/kg, および10mg/kgの3群とし、1群5例のラットを供した。最終投与の3時間後に採血して、血小板数を測定した。

図1に、このようにして測定された各群の血小板数を示す。化合物Bの投与量に依存して血小板数の減少が認められることが示された。

次に、採血後のラットから脾臓をサンプリングし、その下縁部の一部を巨核球数のカウント用に4%パラホルムアルデヒド(PFA)にて固定し、パラフィン切片を常法により作製し、HE染色(hematoxylin-eosin staining)を施した。各個体について1切片上の巨核球数を、対物10倍のレンズを用いて明視野下にてカウントし、

25 その数を切片の面積で除算したものを脾臓内の巨核球数とした。

図2に、このようにしてカウントされた巨核球数の群平均を示す。化合物Bの投与量依存的に脾臓内の巨核球数が増加することが示された。

実施例2 HDAC阻害薬を投与したラット脾臓におけるGATA-1 mRNAの定量

実施例 1 でサンプリングした脾臓の残りをすべて凍結後、RNeasy (RNA 抽出キット) をもちいて Total RNA を抽出し、これを鑄型として、Random Primer 法にて cDNA を合成した。続いてこの cDNA を鑄型として ABI Prism7700 を用いて Real-time PCR (SYBR 法) により GATA-1 の cDNA を増幅させ、その増殖曲線により GATA-1 の mRNA 量を定量した。

巨核球 1 個あたりの GATA-1 の転写量を正確に定量する為に、巨核球で特異的に発現し、HDAC 阻害薬の投与によっても、巨核球 1 個あたりでの発現量にあまり変動をきたさない遺伝子を mRNA 定量の内部標準として用いる必要がある。そこで、巨核球系の培養細胞である HEL 細胞における HDAC 阻害薬による遺伝子発現の変動を Gene Chip (Affymetrix) を用いて解析し、Glycoprotein IIb (GPIIb) を内部標準として選択した。

図 3 にその GPIIb を内部標準として測定した GATA-1 の発現量を示した。HDAC 阻害薬化合物 B の投与量に依存して GATA-1 の転写抑制が認められた。

以上の実験結果から、HDAC 阻害薬投与によって血小板減少が認められたラットにおいて、巨核球での GATA-1 の転写抑制が見られることが判明した。

実施例 3 IL-2 Reporter Gene Assay 用のレポーター遺伝子プラスミッドの構築

ヒト IL-2 遺伝子転写開始点近傍の-674 ～ +54 の領域 (IL-2 遺伝子の主要な転写開始点を +1 とする) をカバーする DNA 断片を、ヒト T 細胞由来の Jurkat 細胞より単離した Genomic DNA を鑄型にして、PCR 法により取得した。PCR に用いたプライマーの配列を、配列表の配列番号 1 及び 2 に示す。これらプライマーは遺伝子データベース GenBank に記載されたヒト IL-2 遺伝子配列 (Locus code: HSIL05, Accession Number: X00695) に基づいて設計され、その末端には、Reporter Gene Assay 用ベクターに挿入するための制限酵素認識部位が付加された。すなわち、増幅 DNA 断片のプロモーター上流側には Nhe I 認識部位、プロモータ一下流側に Hind III 認識部位が形成されるように設計された。PCR により増幅した DNA 断片をクローニングベクター pCR4 (Invitrogen 社製) に挿入し、得られたプラスミッドから挿入領域の塩基配列を確認した。その結果、上記の GenBank に記載された IL-2 遺伝子のプロモーター配列と比較して、3ヶ所の塩基置換、1ヶ所の 2 塩基挿入及び 1

ケ所の 1 塩基挿入部位を除いて、一致することが確認された。その 731 塩基対からなる全塩基配列を、配列番号 8 に示す。このようにして得られたプラスミッドを Nhe I 認識部位及び Hind III 認識部位で切断して、さらに得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む Reporter Gene Assay 用ベクター pGL3 basic (Promega 社製) の Nhe I - Hind III 部位に挿入した。これにより、ヒト IL-2 遺伝子の転写開始点近傍の-674 ~ +54 の領域 728 塩基対に相当する 731 塩基対の DNA 配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミッド pGL3 IL-2 Pro を得た。

次に、pGL3 IL-2 Pro を鋳型にして、ヒト IL-2 遺伝子の転写開始点近傍の-378 ~ +54 の領域をカバーする DNA 断片を、PCR 法により取得した。PCR に用いたプライマーの配列を、配列表の配列番号 3 及び 2 に示す。配列番号 3 のプライマーは前述の pGL3 IL-2 Pro に挿入されている DNA 配列を元に設計された。プライマーの末端には、Reporter Gene Assay 用ベクターに挿入するための、制限酵素認識部位が付加されており、増幅 DNA 断片においてプロモーター上流側に Nhe I 認識部位、プロモータ下流側に Hind III 認識部位を有するように設計されている。PCR により増幅した DNA 断片をクローニングベクター pCR4 に挿入し、得られたプラスミッドを用いて、その挿入領域の塩基配列を確認した。この挿入領域は、GenBank の Locus code: HSIL05 に記載された IL-2 のプロモーター配列の-378 ~ +54 の領域と比較すると、2 ケ所の塩基置換部位と 1 ケ所の 2 塩基挿入部位を除いて、他は一致した。434 塩基対からなるその全塩基配列を配列番号 9 に示す。このようにして得られたプラスミッドを Nhe I 認識部位及び Hind III 認識部位で切断し、得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む Reporter Gene Assay 用ベクター pGL3 basic の Nhe I - Hind III 部位に挿入した。これにより、ヒト IL-2 遺伝子転写開始点近傍-378 ~ +54 の 432 塩基対に相当する 434 塩基対のプロモーター配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に有するプラスミッド pGL3 IL-2 Pro43 を得た (図 4)。

実施例 4 GATA-1 Reporter Gene Assay 用のレポーター遺伝子プラスミッドの構築

ヒト GATA-1 遺伝子転写開始点近傍の-789 ~ +30 の領域、819 塩基対断片を、ヒ

ト Genomic DNA を鋳型にして、PCR 法により取得した。PCR には、配列表の配列番号 4 及び 5 に示したプライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベース GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載されたヒト GATA-1 遺伝子配列を元に設計し、プライマーの末端には、Reporter Gene Assay 用ベクターに挿入するための 5 制限酵素認識部位を附加して、増幅 DNA 断片のプロモーター上流側に Bgl II 認識部位、プロモータ下流側に Hind III 認識部位が形成されるようにした。PCR により増幅した DNA 断片をクローニングベクター pCR4 に挿入した。得られたプラスミッドを用いて、挿入領域の塩基配列を確認したところ、GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載された GATA-1 のプロモーター配列と完全に一致していた。その 10 全塩基配列を配列番号 10 に示す。さらに、得られたプラスミッドを Nhe I 認識部位及び Hind III 認識部位で切断した。得られた断片を、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含む Reporter Gene Assay 用ベクター pGL3 basic の Nhe I - Hind III 部位 15 に挿入した。これにより、GATA-1 遺伝子のプロモーター領域-789 ~ +30 の 819 塩基対の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するプラスミッド pGL3-IE Promoter を得た (図 5)。

次に、ヒト GATA-1 遺伝子転写開始点上流-3769 ~ -3133 の領域、637 塩基対断片を、ヒト染色体 DNA を鋳型にして、PCR 法により取得した。PCR には、配列表の配列番号 6 及び 7 に示したプライマーを用いた。これらプライマーは遺伝子データベース GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載されたヒト GATA-1 遺伝子配列に従って設計され、プライマー末端には、Reporter Gene Assay 用ベクターに挿入するための制限酵素認識部位が附加されて、増幅 DNA 断片のプロモーター上流側に Kpn I 認識部位、プロモータ下流側に Nhe I 認識部位が形成されるようにした。PCR により増幅した DNA 断片をクローニングベクター pCR4 に挿入し、得られたプラスミッドを用いて、挿入領域の塩基配列を確認したところ、GenBank の Accession 番号 AF196971 に記載された GATA-1 遺伝子の転写開始点上流配列と完全に一致していた。637 塩基対からなるその全塩基配列を配列番号 11 に示す。このようにして得られたプラスミッドを Kpn I 認識部位及び Nhe I 認識部位で切断し、得られた DNA 断片を、pGL3-IE Promoter の Kpn I - Nhe I 部位に挿入した。これにより、

GATA-1 遺伝子の転写開始点上流-3769 ~ -3133 の領域の 637 塩基対、及び-789 ~ +30 の 819 塩基対の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流に有するプラスミッド pGL3-HSI-IE Promoter を得た (図 6)。

5

実施例 5 IL-2 転写抑制作用を有する HDAC 阻害剤のスクリーニング系の構築

実施例 3 で得られた 1 μ g の pGL3 IL-2 Pro43 と 6 μ g の任意のキャリヤープラスミッドを混和し、エレクトロポレーション法 (電圧 300V、電荷 975 μ F、400 μ L) により、1 \times 10⁷ cells の Jurkat 細胞を形質転換した。形質転換後、2.5 mL の 10 % FBS を含む RPMI 1640 (10 % FBS RPMI 1640) を加え、50 μ L/well の割合で、96-well white plate に分注した。37 °C、5 % CO₂、飽和湿度条件下で 12 時間培養後、終濃度の 4 倍濃度の化合物 D (HDAC 阻害剤) を含む 10 % FBS RPMI 1640 培地を 25 μ L/well ずつ加え、更に Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA, SIGMA)、Ionomycin (SIGMA)、Anti CD28 antibody (Pharmingen) を 10 % FBS RPMI 1640 で混合した液 25 μ L/well ずつ加え (終濃度それぞれ 50 ng/mL、1 μ g/mL、75 ng/mL)、Jurkat 細胞を刺激した。37 °C、5 % CO₂、飽和湿度条件下で 12 時間培養後、Bright-GloTM Luciferase Assay System (Promega Corporation) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンター (1420 MULTILABEL COUNTER ARVO SX, WALLAC) により測定した。その結果、PMA、Ionomycin、Anti CD28 antibody による Jurkat 細胞へに刺激に応答して、pGL3 IL-2 Pro43 からルシフェラーゼが誘導されたことがわかった (図 7)。更に、誘導されるルシフェラーゼの発現量は、化合物 D により用量依存的に抑制されることがわかった (図 7)。また、化合物 D によるルシフェラーゼの発現量の抑制が、化合物 D によって細胞が何らかの障害を受けた結果ではないことは、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて確認した (図 8)。以上の結果から、本アッセイ系が、IL-2 転写抑制作用を有する HDAC 阻害剤のスクリーニングに使用可能なことがわかった。

実施例 6 GATA-1 転写抑制作用を有する HDAC 阻害剤化合物 D のスクリーニング系の構築

実施例 2 で得られた $15 \mu\text{g}$ の pGL3-HSI-IE Promoter を用いて、エレクトロポレーション法（電圧 1750V、電荷 $10 \mu\text{F}$ 、 $365 \mu\text{L}$ ）により、 8.75×10^6 cells の HEL 細胞（JCRB0062、Japanese Collection of Research Bioresources）を形質転換した。形質転換後、 2 mL の 10 % FBS RPMI 1640 を加え、 $50 \mu\text{L}/\text{well}$ の割合で、96-well white plate に分注した。37 °C、5 % CO_2 、飽和湿度条件下で 3 時間培養後、終濃度の 2 倍濃度の HDAC 阻害剤化合物 D を含む 10 % FBS RPMI 1640 培地を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加えた。37 °C、5 % CO_2 、飽和湿度条件下で 8 時間培養後、Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega Corporation) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンターにより測定した。その結果、pGL3-HSI-IE Promoter から GATA-1 のプロモーターに依存したルシフェラーゼが誘導され、更に、誘導されるルシフェラーゼの発現量は、化合物 D により用量依存的に抑制されることがわかった（図 9）。また、化合物 D によるルシフェラーゼの発現量の抑制が、化合物 D によって細胞が何らかの障害を受けた結果ではないことは、Cell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を用いて確認した（図 10）。以上の結果から、本アッセイ系が、GATA-1 転写抑制作作用を有する HDAC 阻害剤のスクリーニングに使用可能なことがわかった。

実施例 7 免疫抑制作用を有する HDAC 阻害剤のラット心移植の最小有効用量における血小板減少率の確認

被験物質としてランダムに選んだ HDAC 阻害剤 9 化合物（表 1 及び表 2 に示す）について、ACI ラットをドナー (Donor)、Lewis ラットをレシピエント (Recipient) とした頸部への異所性心移植 (Cuff 法) モデルにおいて評価した。各化合物は 10% HCO-60 (Polyoxyl 60 Hydrogenated Castor Oil) /Water を溶媒として経口にて、或いは 10% HCO-60/saline を溶媒として皮下にて、移植当日から 1 日 1 回・14 日間連日投与した。心拍動の停止を拒絶と判断し、その前日までを生着日数とした。尚、対照群（溶媒投与群）の生着日数の中央値が 5 日であることから、8 日以上の中央値をもって有効と判断し、それぞれの最小有効用量を求めた。

【0001】

次に、それぞれ求めた最小有効用量の薬剤量を、正常 Lewis ラットに薬効試験と

同一の投与経路にて 1 日 1 回計 7 回投与した。最終投与日翌日に採血し、各個体の血小板数を測定し、各群 (n=4) の平均値から対照群 (control) に対する減少率 (%) を求めた。

5 表 1 及び表 2 に、このようにして求めた各種 HDAC 阻害剤のラット心移植モデルにおける最小有効用量と血小板減少率を示す。最小有効用量と判断される用量を下線太字で示した。

【表 1】

化合物	投与 経路	Dose (mg/kg)	ラット心移植における効果		血小板減少 率 (%)
			生存日数(日)	中央値 (日)	
Control (溶媒)	p. o.		5, 5, 5, 5, 5, 5, 6, 6	5	0
化合物 A	s. c.	10	5, 5, 5, 5, 6, 6, 10	5	
		<u>32</u>	17, 17, 18, 19, 19, 21	18.5	75
化合物 B	p. o.	1	5, 5, 5, 6, 6, 6, 9	6	
		<u>3.2</u>	7, 7, 11, 11, 11, 11, 27	11	37
化合物 C	p. o.	3.2	4, 4, 4, 5, 5, 5, 5, 6	5	
		<u>10</u>	5, 5, 5, 5, 12, 15, 17, 20	8.5	44
化合物 D	p. o.	3.2	5, 5, 6, 6, 6, 6, 6	6	
		<u>10</u>	18, 19, 19, 19, 20, 21, 24	19	40

【表2】

化合物	投与 経路	Dose (mg/kg)	ラット心移植における効果		血小板減少 率 (%)
			生存日数(日)	中央値(日)	
化合物 E	p. o.	0.32	5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 5, 9	5	34
		<u>1</u>	5, 6, 7, 11, 17, 18, 20	11	
化合物 G	s. c.	0.56	5, 5, 6, 9	5.5	23
		<u>1.8</u>	5, 9, 9, 9	9	
化合物 F	s. c.	0.32	4, 5, 10, 10	7.5	27
		<u>1</u>	21, 21, 23, 23	22	
化合物 H	s. c.	0.32	5, 6, 6, 6	6	8.5
		<u>1</u>	12, 15, 16, 17, 20, 21, 22	17	
化合物 I	s. c.	0.56	N. T.		17
		<u>1.8</u>	18, 18, 19, 19	18.5	

実施例 8

免疫作用を有しあつ血小板減少作用の少ない HDAC 阻害剤を選択する方法

5 被験物質として表3に示す化合物を使用し、実施例3に示したIL-2転写抑制作用を有するHDAC阻害剤のスクリーニング方法を用いてアッセイを行い、被験物質を添加していない場合のルシフェラーゼの発現量を100%とした場合の薬物用量作用曲線から、ルシフェラーゼの発現量を50%抑制する薬物濃度を、薬物によるIL-2の転写抑制に対するIC50値(IL-2 IC50)として算出した(表3)。次に、被
10 験物質として表1に示す化合物を使用し、実施例4に示したGATA-1転写抑制作用を有するHDAC阻害剤のスクリーニング方法を用いてアッセイを行い、被験物質を添加していない場合のルシフェラーゼの発現量を100%とした場合の薬物用量作

用曲線から、ルシフェラーゼの発現量を 50% 抑制する薬物濃度を、薬物による GATA-1 の転写抑制に対する IC50 値 (GATA-1 IC50) として算出した (表 3)。更に、 GATA-1 IC50 を IL-2 IC50 で除した値を、G/I 比として求めた (表 3)。実施例 5 で得られた被験物質のラット心移植の最小有効用量での血小板減少率と、本実施例で得られた G/I 比をプロットしたところ (図 11)、良好な相関が得られた。そして、 G/I 比が、5 以上の化合物では、ラット心移植モデルにおいて免疫抑制効果を示す最小有効用量で、血小板減少率が 30% 以下に抑えられていることがわかった。以上の結果から、本アッセイ系が、免疫作用を有しつつ血小板減少作用を起こしにくい HDAC 阻害剤をスクリーニングするのに適した方法であることが確認された。

10

【表 3】

HDAC 阻害剤	(nM)	Reporter	Gene	Assay	IC50	Ratio GATA-1/IL-2
		IL-2	GATA-1			
化合物 A	342.9		475.7		1.39	
化合物 B	32.3		117.3		3.63	
化合物 C	8.7		32.6		3.73	
化合物 D	27.5		117.3		4.27	
化合物 E	30.7		150.5		4.90	
化合物 F	23.1		128.0		5.53	
化合物 G	14.8		91.0		6.16	
化合物 H	6.1		37.8		6.20	
化合物 I	19.6		148.6		7.58	

実施例 9

HDAC 阻害剤による血小板減少作用に関する転写因子の GeneChip 解析を用いた探

巨核球で発現している遺伝子の中から、HDAC 阻害薬で GATA-1 と同様のパターンで転写が抑制される遺伝子を GeneChip (Affymetrix 社) を用いて選別してグループ化し、それらの遺伝子群に共通な転写因子を探索した。

ヒト巨核球系培養細胞 HEL 細胞を血小板減少作用が見られる 2 種類の HDAC 阻害薬 (500 nM 及び 1500 nM の化合物 A, 100 nM 及び 300 nM の化合物 D) で 8 時間処理し、RNeasy Kit (QIAGEN 社) を用いて Total RNA を抽出した。得られた total RNA を鋳型として Superscript Choice System (Invitrogen 社) を用いて cDNA 合成し、さらに BioArray High Yield RNA transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics 社) を用いて蛍光標識の cRNA を合成した。得られた蛍光標識の cRNA をプローブとし、Human Genome U95A Array (Affymetrix 社) を用いて 12,626 種類の遺伝子についてその発現パターンを調べた。

GATA-1 遺伝子の転写に及ぼす上記 2 種類の HDAC 阻害薬の効果は、図 1 2 のパターンを示した。遺伝子発現解析ツール GeneSpring (Silicon Genetics 社) による発現パターンの比較解析の結果、この GATA-1 遺伝子と同様のパターンによって HDAC 阻害薬により転写抑制される遺伝子が、45 種類見出された (図 1 3)。これらの遺伝子の中から、さらに、血球分化に関わる機能を有すると想定される転写因子の候補遺伝子あるいは巨核球マーカー遺伝子と想定される候補遺伝子を絞り込み、以下の 10 遺伝子を得た。

20 SCL (GenBank Accession Number M63589: P. D. Aplan et al., (1990) Mol. Cell. Biol. 10 (12), 6426-6435)

NF-E2 (GenBank Accession Number S77763: C. Pischedda et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (8), 3511-3515)

25

EKLF (GenBank Accession Number U65404: J. H. van Ree et al., (1997) Genomics 39 (3), 393-395)

Pleckstrin (GenBank Accession Number X07743: M. Tyers et al., (1988) Nature

333 (6172), 470-473)

Thrombin-R (GenBank Accession Number M62424: T. K. Vu et al., (1991) Cell 64 (6), 1057-1068)

5

LM02 (GenBank Accession Number X61118: B. Royer-Pokora et al., (1991) Oncogene 6 (10), 1887-1893)

PU.1 (GenBank Accession Number X52056: D. Ray et al., (1990) Oncogene 5 (5), 10 663-668)

Fli-1 (GenBank Accession Number M98833: D. K. Watson et al., (1992) Cell Growth Differ. 3 (10), 705-713)

15 AML1 (GenBank Accession Number D43968: H. Miyoshi et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 (23), 10431-10434)

TCF11 (GenBank Accession Number L24123: J. Y. Chan et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (23), 11371-11375)

20

次に、ヒトゲノムの配列情報 (Genome Annotation, NCBI Locus Link) より上記の各遺伝子転写開始部位上流 2kb の配列情報をダウンロードし、転写制御領域予測支援システム TRANSFAC (E. Wingender et al., (2000) Nucleic Acids Research 28, 316-319, TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation.) に基づき、転写因子データベース (The Transcription Factor Database, TRANSFAC ® Professional 6.3, BIOBASE Biological Databases/Biologische Datenbanken GmbH) を検索して、ヒト由来の各 promoter 配列に共通して存在する転写因子結合配列を調べた。その際、HDAC 阻害薬にて発現抑制を受けた上記の各遺伝子の転写開始点上流 2kb 以内の転写制御領域において、大半の遺伝子に共通して存在する転写

因子結合配列のうち、さらに、GATA-1 遺伝子 IE promoter 及び HSI 領域のいずれにおいても共通して存在する配列を中心に絞り込んだ。その結果、HDAC 阻害剤による上記各遺伝子の発現抑制に関与する転写因子の候補として以下の①から④の 4 種類を見出した。

5

- ① STAT3: signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
- ② C/EBP β : CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
- ③ HSF1 (又は HSF2) : heat shock transcription factor 1 (又は heat shock transcription factor 2)
- ④ GATA-1: GATA binding protein 1

実施例 10

STAT3、C/EBP β 、HSF1 が認識する応答配列を有するレポーター遺伝子 (Luciferase) ベクターの構築

HDAC 阻害薬による GATA-1 遺伝子の転写制御に関与する転写因子候補である STAT3、C/EBP β 、HSF1 および GATA-1 の 4 種類のうち、STAT3、C/EBP β および HSF1 (または HSF2) の 3 種類の転写因子に関して、各転写因子が認識する応答配列を有するレポーター遺伝子 (Luciferase) ベクターを構築した。

(C/EBP β reporter plasmid)

これまでに報告されている C/EBP β が認識するコンセンサス配列 (M. Rosati et al., (2001) The Journal of Immunology 167, 1654-1662, CCAAT-Enhancer-Binding Protein β (C/EBP β) Activates CCR5 Promoter: Increased C/EBP β and CCR5 in T Lymphocytes from HIV-1-Infected Individuals.) (S. Osada et al., (1996) The Journal of Biological Chemistry 271, 3891-3896, DNA Binding Specificity of the CCAAT/Enhancer-Binding Protein Transcription Factor Family.) を 5 個連結した以下の配列で示される CEBP-11 及び CEBP-12 を設計し、それらの合成

DNA (Amersham Biosciences 社製)を得た。

CEBP-11: 5' -CGCGTTGAGCAAGACTTGAGCAAGTACTTGAGCAAGCGTTGAGCAAGGCTTGAGCAAGC-3'

CEBP-12: 5' -TCGAGCTTGCTCAAGCCTGCTCAACGCTTGCTCAAGTACTTGCTCAAGTCTTGCTCAA-3'

5

上記2種の合成DNAを混合してアニーリングすることにより、図14 (a)に示されるC/EBP β 結合配列の断片を得た。この断片を、TA最小プロモーター(TA minimal promoter)を有するpTA-Luc (BD Biosciences Clontech社)のマルチクローニングサイトMluI/XhoI部位に挿入し、pC/EBP β -TA-Lucを得た。一方、pTAL-Luc (BD Biosciences Clontech社)をBglII/SphI処理してTALプロモーター配列及びホタルルシフェラーゼ遺伝子(Firefly luciferase gene)N末端側領域をコードする約0.7kb断片を得た。この断片を、pC/EBP β -TA-LucをBglII/SphI処理して得られた約4.2kb断片と連結させることにより、C/EBP β 結合配列の下流にTALプロモーター配列及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を有するC/EBP β レポータープラスミッドであるpC/EBP β -TAL-Lucを得た。

(HSE reporter plasmid)

pHSE-TAL-Luc (BD Biosciences Clontech社)で用いられているHSE(heat shock promoter element)配列に従い、以下の配列で示されるHSE-11及びHSE-12を設計し、それらの合成DNA (Amersham Biosciences社製)を得た。

HSE-11: 5' -CGCGTCTAGAACATGTTCTAGATCTAGAACATTCTAGCTAGAACATGTTCTAGAC-3'

HSE-12: 5' -TCGAGTCTAGAACATTCTAGCTAGAACATGTTCTAGATCTAGAACATTCTAGA-3'

25 上記2種の合成DNAを混合してアニーリングすることにより、図14 (b)に示されるHSE配列の断片を得た。この断片を、pTA-Luc (BD Biosciences Clontech社)をMluI/XhoI処理して得られた約4.9kb断片と連結させることにより、pHSE-TA-Lucを得た。一方、pTAL-Luc (BD Biosciences Clontech社)をBglII/SphI処理してTALプロモーター配列及びホタルルシフェラーゼ遺伝子N末端側領域を

コードする約 0.7 kb 断片を得た。この断片を、pHSE-TA-Luc を BglII/SphI 処理して得られた約 4.2 kb 断片と連結させることにより、HSE 配列の下流に TAL プロモーター配列及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を有する HSF1 レポーター プラスミッドである pHSE-TAL-Luc を得た。

5

(pSTAT3 reporter plasmid)

pTAL-Luc (BD Biosciences Clontech 社) を BglII/SphI 処理して TAL プロモーター配列及びホタルルシフェラーゼ遺伝子 N 末端側領域をコードする約 0.7 kb 断片を得た。この断片を、pSTAT3-TA-Luc (BD Biosciences Clontech 社) を BglII/SphI 処理して得られた約 4.2 kb 断片と連結させることにより、図 14 (c) に示される STAT3 結合配列の下流に TAL プロモーター配列及びホタルルシフェラーゼ遺伝子を有する STAT3 レポーター プラスミッドである pSTAT3-TAL-Luc を得た。

実施例 11

15 HDAC 阻害薬の STAT3、C/EBP β および HSF1 転写活性に対する作用

実施例 10 で得られた 15 μ g の pC/EBP β -TAL-Luc、pHSE-TAL-Luc、pSTAT3-TA-Luc のそれぞれを用いて、エレクトロポレーション法 (電圧 1750V、電荷 10 μ F、365 μ L) により、 8.75×10^6 cells の HEL 細胞を形質転換した。形質転換後、2 mL の 10 % FBS RPMI 1640 に懸濁し、50 μ L/well の割合で、96-well white plate に分注した。37 °C、5 % CO₂、飽和湿度条件下で 3 時間培養後、終濃度の 2 倍濃度の HDAC 阻害薬化合物 D を含む 10 % FBS RPMI 1640 培地を 50 μ L/well ずつ加えた。37 °C、5 % CO₂、飽和湿度条件下で 8 時間培養後、Bright-GloTM Luciferase Assay System (Promega Corporation) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンターにより測定した。その結果、pC/EBP β -TAL-Luc、pHSE-TAL-Luc、pSTAT3-TA-Luc からそれぞれ C/EBP β 、HSF1 および STAT3 の転写活性に依存したルシフェラーゼが誘導された。これらのルシフェラーゼの活性の誘導は、化合物 D により抑制を受けなかった (表 4)。以上の結果から、HDAC 阻害薬による GATA-1 転写抑制作用は C/EBP β 、HSF1 (または HSF2) および STAT3 の転写活性

化阻害によるものではないことが明らかとなった。

【表4】

化合物D (nM)	ルシフェラーゼ活性 (%)		
	pC/EBP β -TAL-Luc	pHSE-TAL-Luc	pSTAT3-TAL-Luc
0	100	100	100
3	173 \pm 3	163 \pm 7	166 \pm 10
10	277 \pm 4	258 \pm 9	238 \pm 7
30	367 \pm 9	338 \pm 18	316 \pm 16
100	388 \pm 5	355 \pm 12	334 \pm 18
300	379 \pm 1	361 \pm 3	326 \pm 13

化合物D非添加時のルシフェラーゼ活性の平均値を100とした相対活性

5 平均値 \pm 標準誤差 (n=3)

実施例 12

GATA-1 プロモーター内の GATA-1 認識部位全てに変異を導入した変異プロモーターを有するレポーター遺伝子 (Luciferase) ベクターの構築

10

GATA-1 プロモーター内には GATA-1 自身が認識する応答配列 (GATA 配列) が存在している。HDAC 阻害薬による GATA-1 遺伝子の転写制御がこの GATA 配列を介した転写制御系と関連するかどうかを調べる目的で、GATA 配列内に変異を導入して GATA-1 自身が認識する応答配列を消失させたプロモーターを人工的に構築し、レポーター遺伝子と連結させたベクターの構築を行なった。

即ち、GATA-1 遺伝子 IE プロモーター領域の GATA 配列 5箇所に変異を導入した IE promoter (mutant) 約 0.84 kb を、PCR 法を利用して人工的に構築した。その際、実施例 4 で得られた pGL3-HSI-IE DNA を 1 度目の PCR におけるテンプレートとし用いて、当該 promoter 領域の両端及び各変異導入配列に対応した合成プライマーを用いて、領域端または各変異導入箇所で挟まれる断片を増幅させた。このようにして

得られた PCR 後の生成物を混合して再度の PCR 反応のテンプレートとして用い、合成プライマーの種類を絞り込むことによって、より長い領域を増幅させた。さらに、このような PCR を繰り返すことによって、領域両端に対応した合成プライマー対により IE プロモーター領域全域に相当する PCR 断片を得たので、
5 pCR4-TOPO(Invitrogen)へ挿入し、塩基配列を決定して設計どおりに変異が導入されていることを確認した。図 15 にそのようにして確認された IE promoter (mutant) の配列を示す。変異導入部分は下線で示されており、両末端には、それぞれ *Bgl* II site 及び *Hind* III site が導入されている。この IE promoter (mutant) 全域を含む *Bgl* II- *Hind* III 断片を pGL3 の *Bgl* II - *Hind* III site 間に挿入し
10 て、pGL3-IE promoter (mutant) を得た。

また、同様の PCR を用いる手法によって、GATA-1 遺伝子 HSI 領域の GATA 配列 2箇所に変異を導入した HSI (mutant) 領域約 0.65 kb を、実施例 4 で得られた pGL3-HSI-IE DNA を 1 度目の PCR におけるテンプレートとして人工的に構築した。
15 得られた PCR 断片を pCR4-TOPO(Invitrogen)へ挿入し、塩基配列を決定して変異導入を確認した。図 16 にそのようにして確認された HSI (mutant) 領域の配列を示す。変異導入部分は下線で示されており、両末端には、それぞれ *Mlu* I site 及び *Bgl* II site が導入されている。この HSI (mutant) 領域全域を含む *Mlu* I - *Bgl* II 断片を pTAL-Luc の *Mlu* I - *Bgl* II site 間に挿入して、pTAL-HSI (mutant)-Luc を
20 得た。さらに、pTAL-HSI (mutant)-Luc の HSI (mutant) 領域全域を含む *Kpn* I - *Bgl* II 断片を pGL3-IE promoter (mutant) の *Kpn* I - *Bgl* II 間へ挿入して、IE promoter (mutant) 全域と HSI (mutant) 領域全域を含む pGL3-HSI-IE Promoter (mutant) を得た。

25 実施例 13

HDAC 阻害薬の GATA-1 転写活性に対する作用

実施例 4 で得られた 15 μ g の pGL3-HSI-IE Promoter および実施例 12 で得られた pGL3-HSI-IE Promoter (mutant) を用いて、エレクトロポレーション法(電圧 1,750V、

電荷 $10 \mu F$ 、 $365 \mu L$) により、 8.75×10^6 cells の HEL 細胞を形質転換した。形質転換後、 2 mL の 10% FBS RPMI 1640 に懸濁し、 $50 \mu L/\text{well}$ の割合で、96-well white plate に分注した。37 °C、5 % CO₂、飽和湿度条件下で3時間培養後、終濃度の2倍濃度の HDAC 阻害薬化合物 A、C、D を含む 10% FBS RPMI 1640 培地を $50 \mu L/\text{well}$ ずつ加えた。37 °C、5 % CO₂、飽和湿度条件下で8時間培養後、Bright-GloTM Luciferase Assay System (Promega Corporation) のマニュアルに従い、細胞内のルシフェラーゼ活性を、マルチラベルカウンターにより測定した。その結果、pGL3-HSI-IE Promoter および pGL3-HSI-IE Promoter (mutant) それぞれから GATA-1 プロモーターに依存したルシフェラーゼが誘導されたが、変異プロモーターから誘導されるルシフェラーゼの活性は野生型に比べて低いものであった。また、変異プロモーターから誘導されるルシフェラーゼの活性は野生型の場合と異なり、化合物 A、C、D により抑制を受けなかった (表5)。

以上の結果は、HDAC 阻害薬である化合物 A、C、D は、GATA-1 プロモーター上の GATA 配列を介する転写制御系の機能を抑制することによりその転写活性化機能を阻害していることを示している。GATA 配列は、GATA-1 自身によって認識されることが知られており、この事実は、化合物 A、C、D が GATA-1 因子そのものの転写活性化機能を阻害している可能性を示唆している。

【表5】

ルシフェラーゼ相対活性 (RLU)			
		Wild type GATA-1 promoter	Mutant GATA-1 promoter
化合物 A	(+)	211 ± 13	301 ± 30
	(-)	586 ± 44	317 ± 7
化合物 C	(+)	218 ± 5	311 ± 8
	(-)	609 ± 43	326 ± 11
化合物 D	(+)	203 ± 17	290 ± 23
	(-)	681 ± 68	335 ± 10

20 平均値±標準誤差 (n=3)

産業上の利用の可能性

本発明の方法によれば、2種類の細胞を用いたレポーター・アッセイ系を併用することにより、強力な IL-2 転写抑制活性を示し、同時に GATA-1 転写抑制活性の弱い化合物を迅速にスクリーニングすることが可能である。また、HDAC 阻害剤から 5 GATA-1 転写抑制活性の弱い化合物を迅速にスクリーニングすることも可能である。このような方法で選択された化合物は、免疫抑制剤として、従来より高い確率で血小板減少の副作用を示さない安全性の高い創薬キャンディディットとなることが期待されるので、本発明の方法は、新薬創出の為の研究に極めて有用である。

請求の範囲

1. 以下の (1) 及び (2) からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

(1) 免疫抑制活性を有する化合物を選択する、

5 (2) (1) で選択した化合物から、さらに GATA-1 転写抑制活性の少ない化合物を選択する、

2. 以下の (1) から (3) からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

(1) 被験化合物の免疫抑制活性を測定する、

10 (2) 被験化合物の GATA-1 転写抑制活性を測定する、

(3) (1) で求めた免疫抑制活性と (2) で求めた GATA-1 転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する、

3. 以下の (1) から (3) からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

15 (1) 試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における IL-2 転写抑制活性を測定する、

(2) 試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における GATA-1 転写抑制活性を測定する、

20 (3) (1) で求めた IL-2 転写抑制活性と (2) で求めた GATA-1 転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する、

4. 以下の (1) から (3) からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

(1) IL-2 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における IL-2 転写抑制活性を測定する、

25 (2) GATA-1 レポーター遺伝子を導入した試験用細胞を被験物質と共に存させ、当該試験用細胞における GATA-1 転写抑制活性を測定する、

(3) (1) で求めた IL-2 転写抑制活性と (2) で求めた GATA-1 転写抑制活性を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を選択する、

5. 請求項 4において、IL-2 転写抑制活性として (IL-2 IC50) 値を測定し、GATA-1

転写抑制活性として (GATA-1 IC50) 値を測定し、両者を比較することによる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

6. 請求項 5 に記載の方法において、(GATA-1 IC50) / (IL-2 IC50) 値が 5 以上の化合物を選択することによる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

5 7. GATA-1 レポーター遺伝子が、ヒト GATA-1 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子から構成されるものである請求項 4-6 のいずれかに記載の方法。

8. GATA-1 レポーター遺伝子が、ヒト GATA-1 遺伝子の転写開始点上流の-3769 から -3133 の領域配列及び転写開始点近傍の-789 から +30 の領域配列を含むものである請求項 4-7 に記載の方法。

10 9. IL-2 レポーター遺伝子がヒト IL-2 遺伝子の転写制御領域とレポーター遺伝子から構成されるものである請求項 4-8 のいずれかに記載の方法。

10 10. IL-2 レポーター遺伝子が、ヒト IL-2 遺伝子の転写開始点近傍の-378 から +54 の領域配列を含むものである請求項 4-9 のいずれかに記載の方法。

11 11. GATA-1 レポーター遺伝子を導入する試験用細胞がヒト巨核球系列の細胞株である請求項 4-10 のいずれかに記載の方法。

12 12. IL-2 レポーター遺伝子を導入する試験用細胞が Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Ionomycin 及び Anti CD28 antibody で刺激されたヒト T 細胞由来の細胞株であり、GATA-1 レポーター遺伝子を導入する試験用細胞がヒト巨核球系列の細胞株である請求項 4-11 のいずれかに記載の方法。

13 13. ヒト T 細胞由来の細胞株が Jurkat 細胞である請求項 12 に記載の方法。

14. ヒト巨核球系列の細胞株が HEL 細胞である請求項 11 に記載の方法。

15. ヒト巨核球系列の細胞株が HEL 細胞である請求項 12 に記載の方法。

16. レポーター遺伝子がホタルルシフェラーゼ遺伝子である請求項 4-15 のいずれかに記載の方法。

25 17. 被験物質が HDAC 阻害剤であるところの請求項 1-16 のいずれかに記載の選択方法。

18. GATA-1 蛋白の発現量を測定することによる、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択方法。

19. 次の (1) から (3) からなる血小板減少作用の少ない免疫抑制剤の選択

方法。

- (1) IL-2 蛋白の発現量を測定する、
- (2) GATA-1 蛋白の発現量を測定する、
- (3) 両者の発現量を比較することにより、血小板減少作用の少ない免疫抑制剤を

5 選択する

20. 以下の (1) (2) で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット。

- (1) GATA-1 レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (2) 巨核球細胞系列の試験用細胞

10 21. 以下の (1) から (4) で構成される血小板減少作用の少ない免疫抑制剤選択の為の測定用キット。

- (1) IL-2 レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (2) GATA-1 レポーター遺伝子を含むDNA構築物、
- (3) T 細胞系列の試験用細胞、

15 (4) 巨核球細胞系列の試験用細胞

22. 請求項 1 7 記載の方法により選択された血小板減少作用が少ないHDAC 阻害剤。

23. 請求項 1 – 1 6 のいずれかに記載の選択方法により選択された血小板減少作用の少ない免疫抑制剤。

24. 請求項 2 2 に記載のHDAC阻害剤を有効成分として含む、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療の為の免疫抑制剤。

25. 請求項 2 3 に記載の免疫抑制剤を有効成分として含む炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓器移植片拒絶、自己免疫疾患、癌の治療剤。

26. 請求項 2 2 に記載のHDAC阻害剤を有効成分として含む血小板減少作用が少ない免疫抑制剤を投与することによる、炎症性疾患、糖尿病、糖尿病性合併症、ホモ接合型サラセミア、纖維症、肝硬変、急性前骨髄球性白血病、原虫感染症、臓

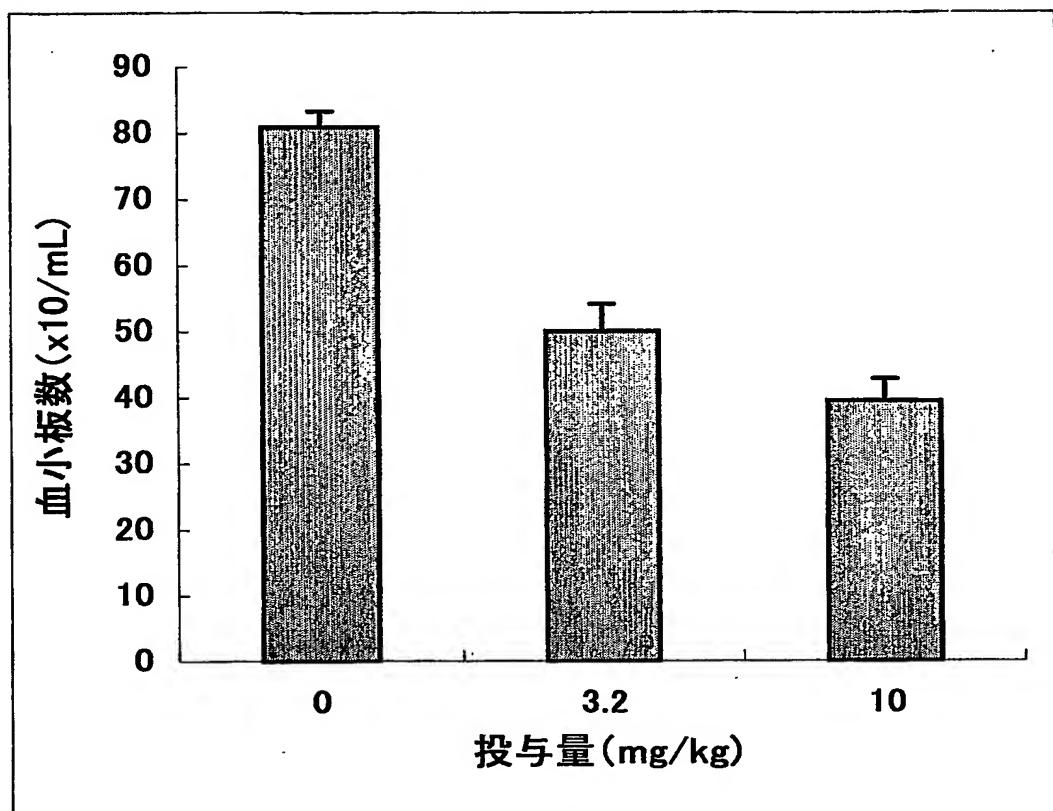
器移植片拒絶, 自己免疫疾患, 癌の治療方法。

27. 請求項23に記載の免疫抑制剤を有効成分として含む血小板減少作用が少ない免疫抑制剤を投与することによる炎症性疾患, 糖尿病, 糖尿病性合併症, ホモ接合型サラセミア, 繊維症, 肝硬変, 急性前骨髄球性白血病, 原虫感染症, 臓器移植片拒絶, 自己免疫疾患, 癌の治療方法。

28. 炎症性疾患, 糖尿病, 糖尿病性合併症, ホモ接合型サラセミア, 繊維症, 肝硬変, 急性前骨髄球性白血病, 原虫感染症, 臓器移植片拒絶, 自己免疫疾患, 癌の治療剤製造の為の請求項22に記載のHDAC阻害剤の使用。

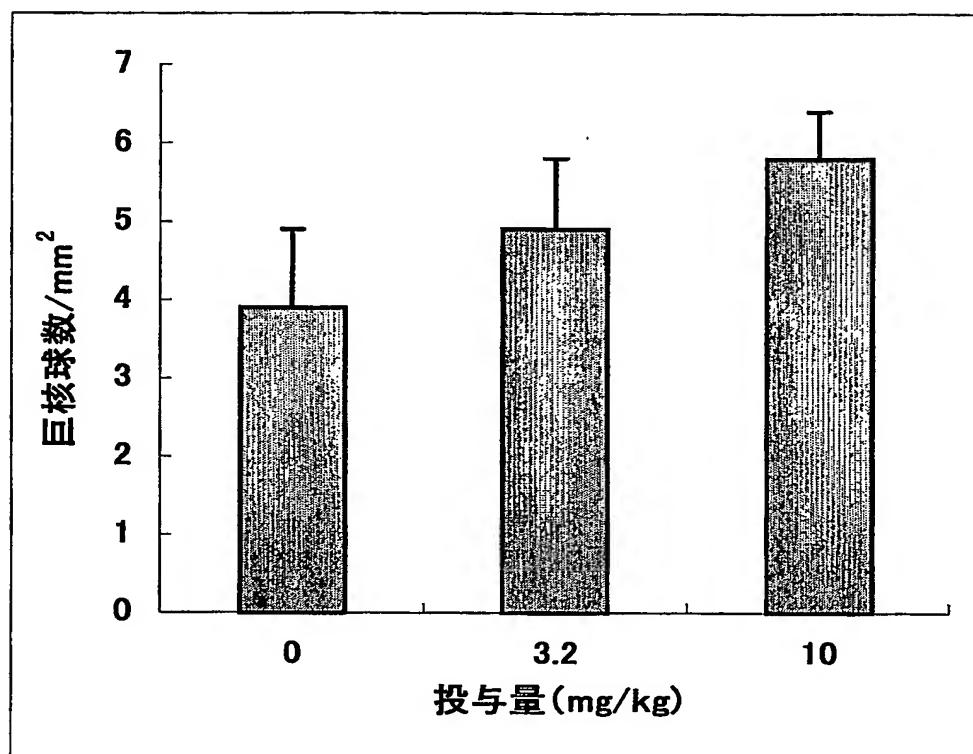
29. 炎症性疾患, 糖尿病, 糖尿病性合併症, ホモ接合型サラセミア, 繊維症, 肝硬変, 急性前骨髄球性白血病, 原虫感染症, 臓器移植片拒絶, 自己免疫疾患, 癌の治療剤製造の為の請求項23に記載の免疫抑制剤の使用。

図 1



2/16

図 2



3/16

図 3

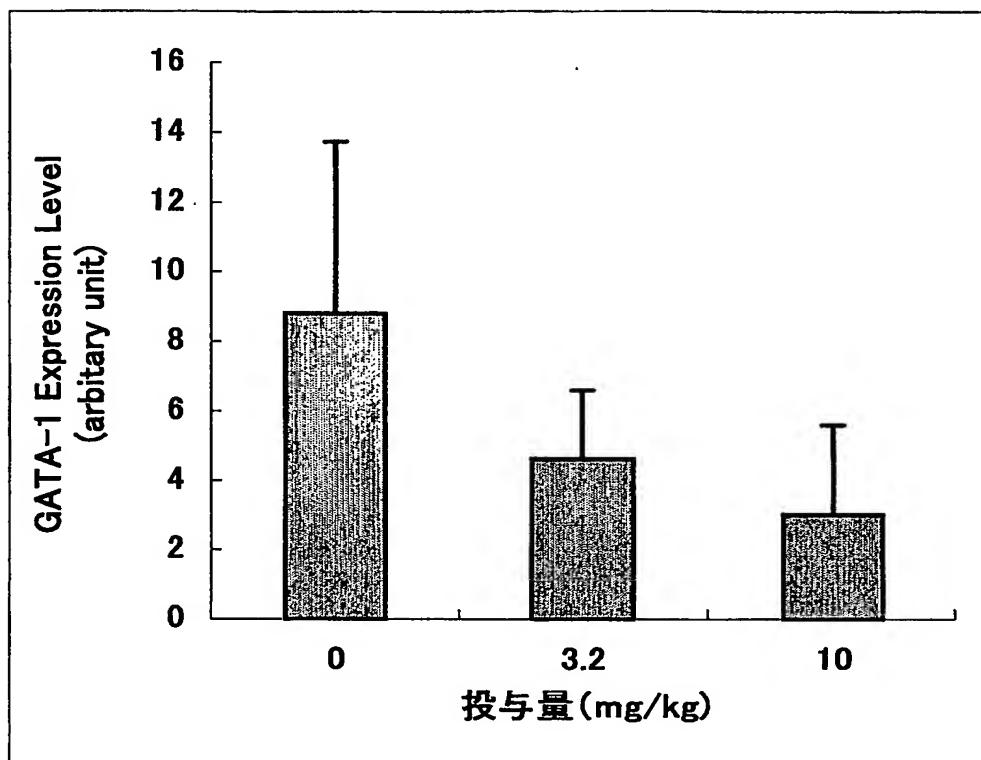


図 4

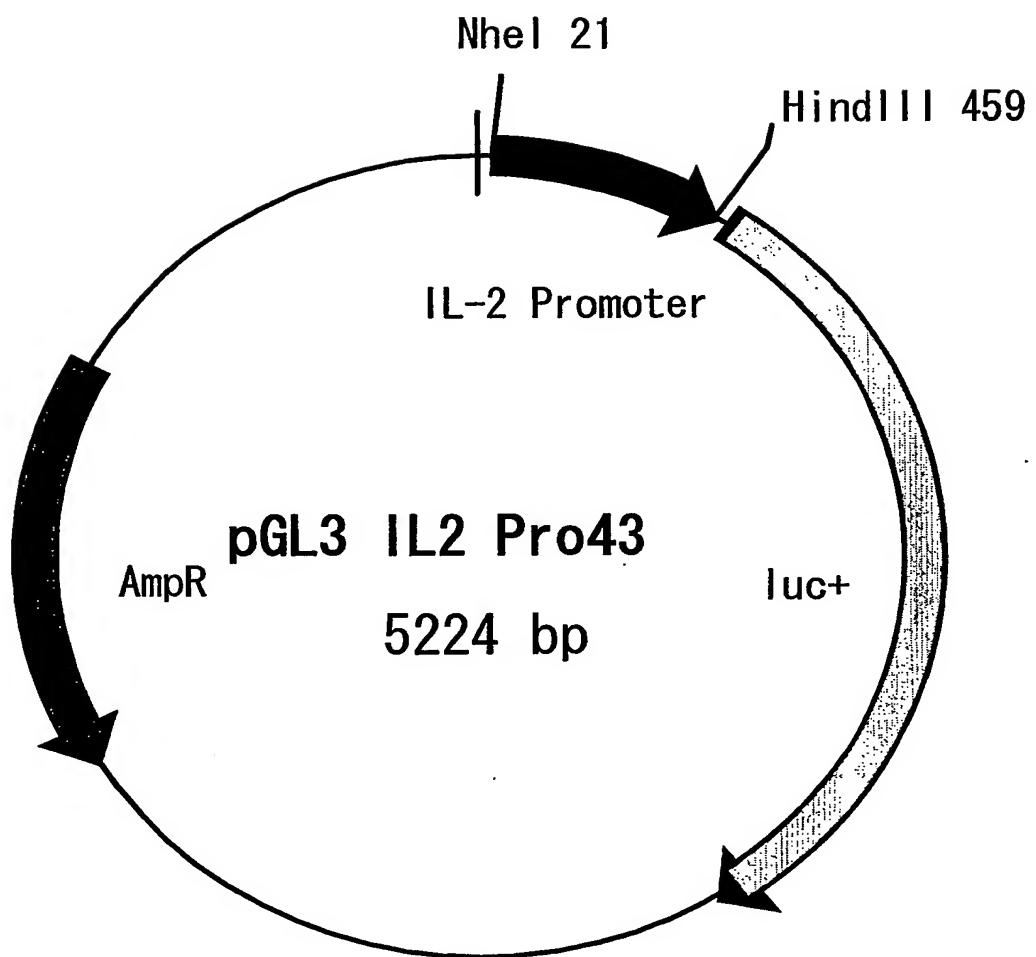


図 5

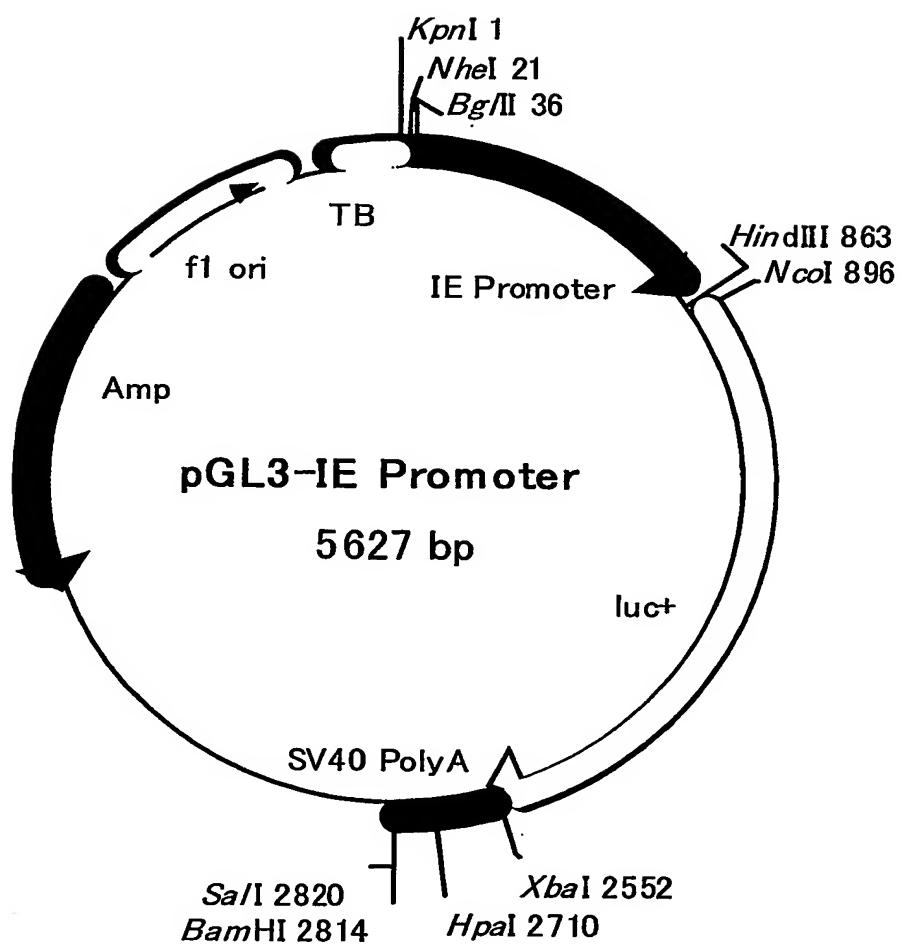
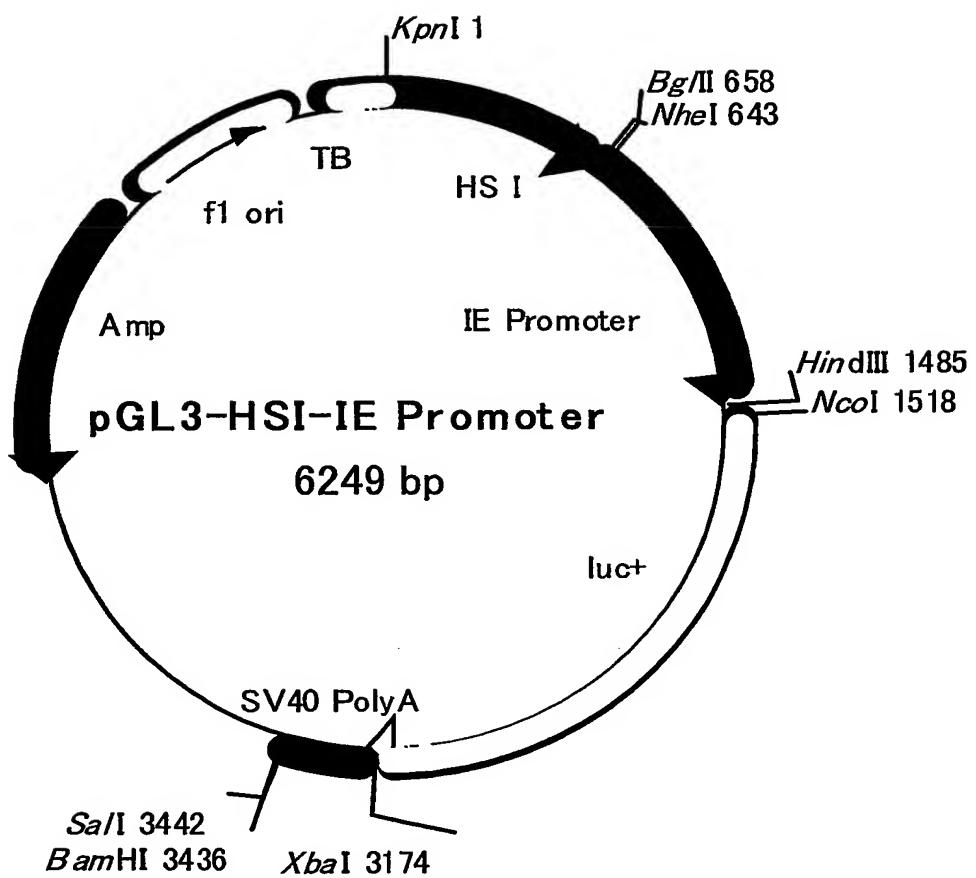
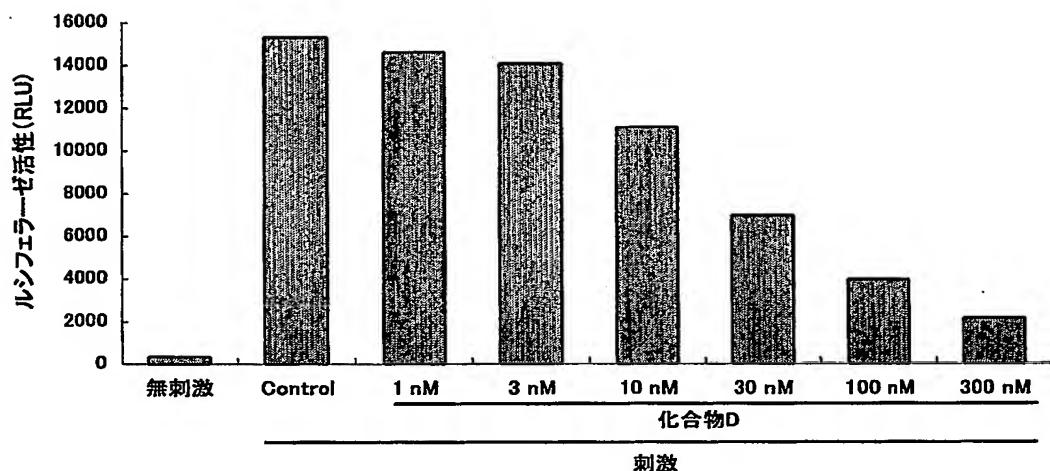


図 6



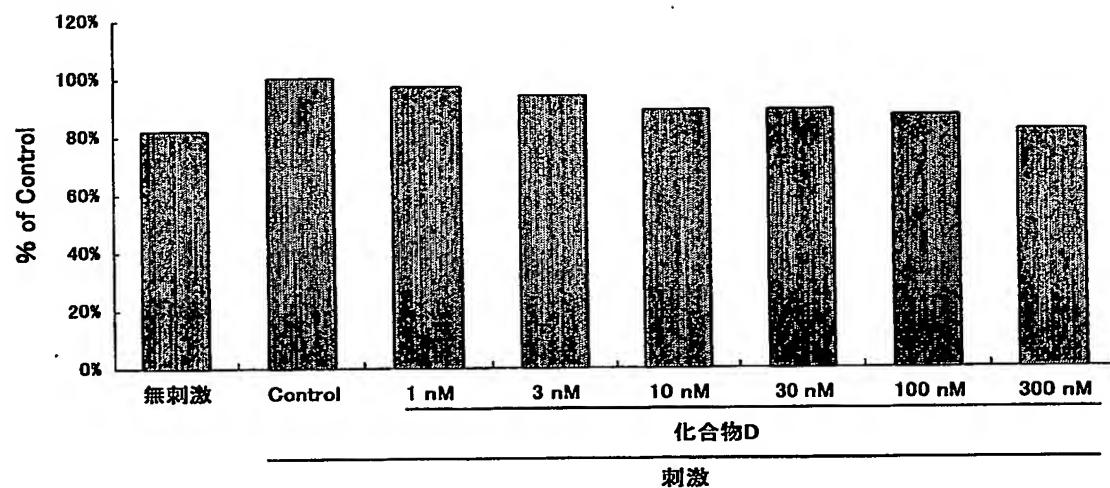
7/16

図 7



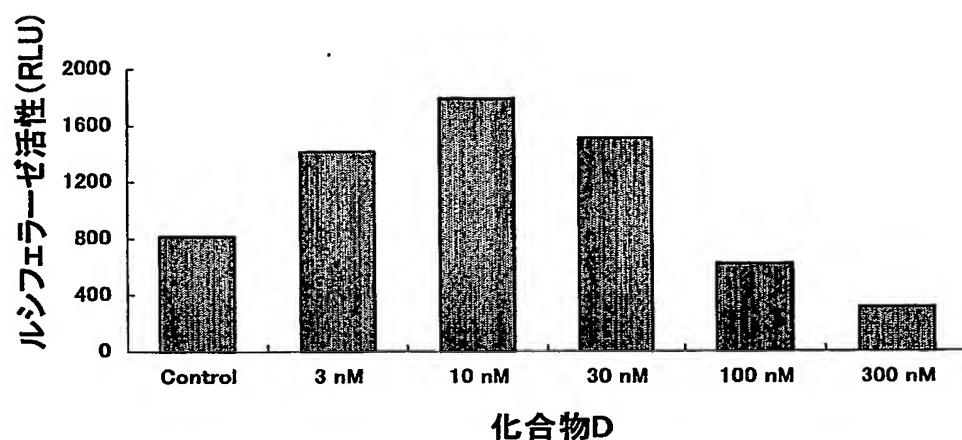
8/16

図 8



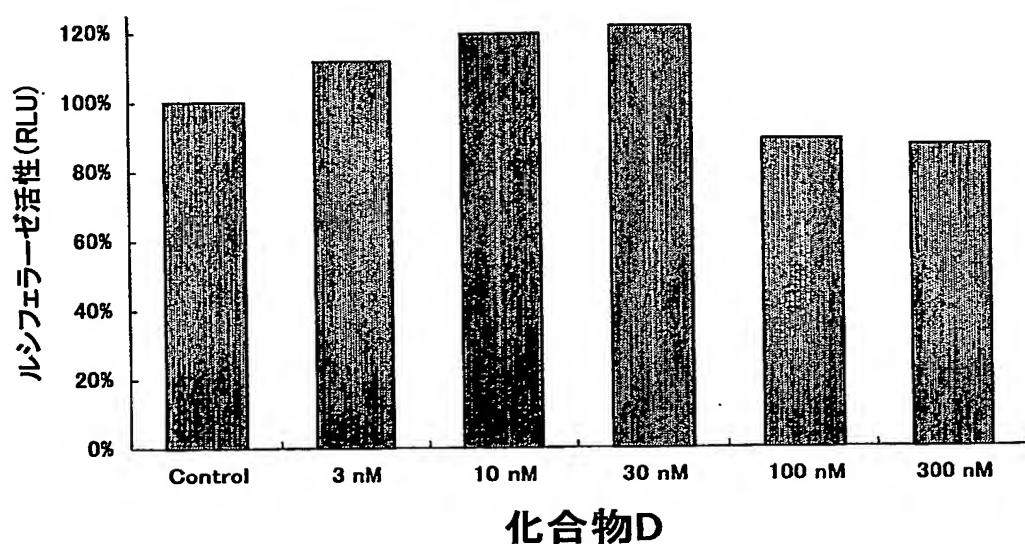
9/16

図 9



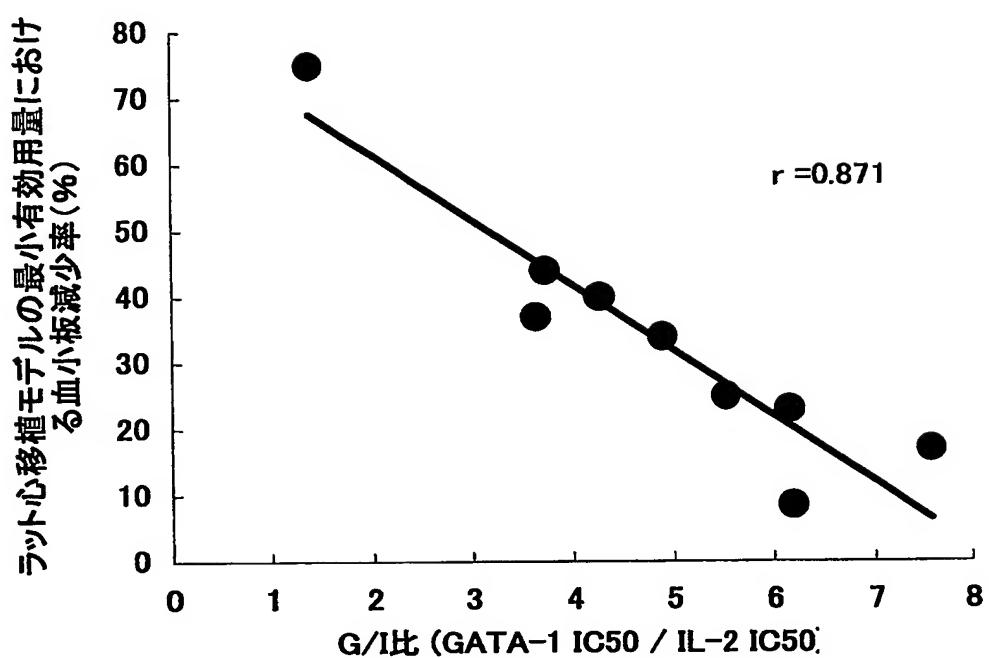
10/16

図10



11/16

図 1 1



12/16

図 1 2

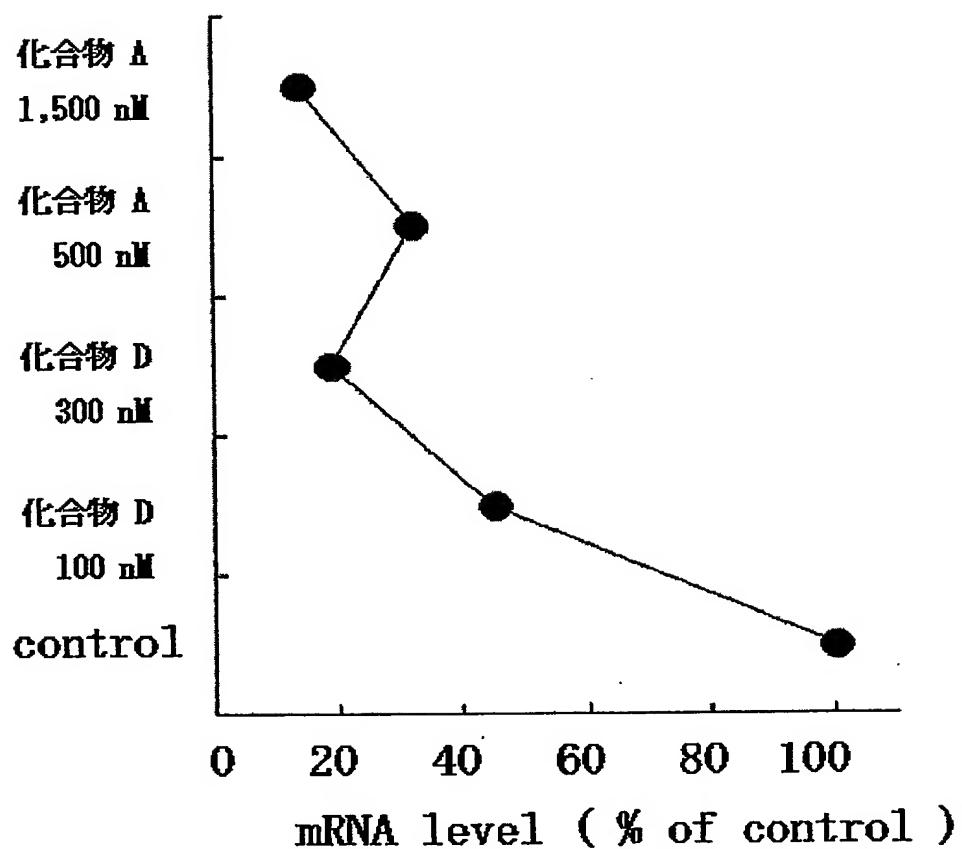


図 1 3

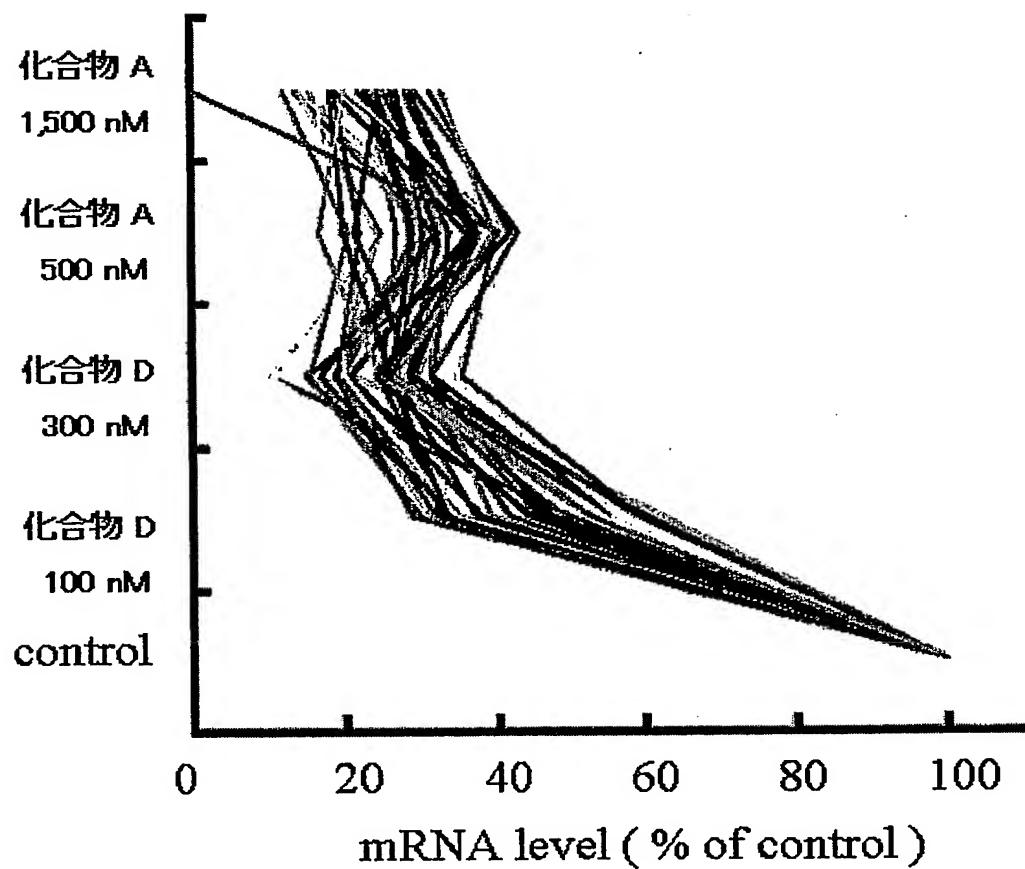


图 14

(a) C/EBP binding sequences:

CEBP-11 5'-CGCGTTGAGCAAGACTTGAGCAAGTACTTGAGCAAGCGTTGAGCAAGGCTTGAGCAAGC-3'

CEBP-12: 3'-AACTCGTTCTGAACTCGTTCATGAACTCGTTGCAACTCGTTCCGAACTCGTTGAGCT-5'

(b) HSE:

HSE-11 : 5'-CGCGTCTAGAATGTTCTAGATCTAGAACATTCTAGCTAGAATGTTCTAGAC-3'

HSE-12 : 3'-AGATCTTACAAGATCTAGATCTTGTAAAGATCGATCTTACAAGATCTGAGCT-5'

(c) STAT3 DNA binding sequences derived from pSTAT3-TA-Luc:

5'-----TCCTTCCCGAACGTTGCTTCCCGAACGTTGCTTCCCGAACGTTGCTTCCCGAACGTTAGATCTGGG-----3'
3'-----ACGAAGGGCTTGCAACGAAGGGCTTGCAACGAAGGGCTTGCAACGAAGGGCTTGCAACGATCTAGACCC-----5'

図15

IE_promoter (mutant)

atagatctga tccctggctc ccacacctg ttcggcgctc caaggcagca 50
*Bgl*III
tggcgggcaa gaagttgagg ccactgtccc tgggtgttcc taccggcaca 100
ccctcaccac aagacagcct gttactgegg cgccaaacagc cacggtcggc 150
tacatctgaG aagacttGtc tgctgcccc gggcaggccg gagctggcgt 200
aagccccagt gggcgctaa gtgagtgtgc ccctgcctcc cgccagcact 250
ggcctggct gcaggcttag cctgggtcat caaggtGtcc cacaggctct 300
agttcaaatc cagcagaacc tctctgagcc tcactcttct cacctgcaaa 350
atgggtacag ccacatccct tctctccctg cagccaggaa gacgcacata 400
cacaggagtc tagccccacac cggcccccga caaattaagg gctttactct 450
ctgaaaagcc cagtgaagtc atgaaaccat aGtgcgtatt ttcatttGtc 500
ttggttttag cctatttgc ttgtctggac actacagtcc acggggagct 550
aggtcgagcg aggtccaaga atccccaggg tgggcaggga ggggtggaaaga 600
gggcctccag tgcccaagag gtggggcaca agcatgggac cggcccccctc 650
ccctggactg cccccccac tggggcacca gcccactccct gggggaggagg 700
gaggagggag aagggaggga gggagggagg gaggaggga gctcaaaagg 750
ccaaggccag ccaggacacc ccctgggatc acactgagct tgccacaGcc 800
ccaaggccgc cgaaccctcc gcaaccacca aagcttat 838

*Hind*III

16/16

図 16

HSI region (mutant)

ctacgcgtac cccagaagat gccaggaggg agtgagccag tcagggaaagg 50
Mlu I
cttccgagaa gagaggacat tgaagaagag tctcaaactt aggccctgacg 100
gagaagacgc gggccagga caccaccc ccccccgt ctccccaaa 150
gcctgatctg gccccactga ttcccttGtc tgcccactcc cagctgcctc 200
cttgcggct gaactgtcgc cgcagaccc tgagcctgcg cccctccac 250
ggggatgggg gagggaatgg ggtgaggcct gcctcacag cctggggtt 300
tccagctctt gctggaggca gggctctggg gcccctact cctcaccctt 350
ggcttctctt cctgagcgct ctgtgcttc cagaaatgaa gaaatggggt 400
gagtccagcg gccaaaccct tgtcttagct cttagacatg cctcgagcct 450
gccattccct gtgaggacag attccctat gttgcgaccg ctgcttctaa 500
taataataat gatgatgaattcccttt acagagcaca ccatttatgg 550
tgtgccagca ggcctgtgc tgagtggttc ctaccacgt gggggctag 600
gactttaccc gtttccaga tgaagaaact gaggctcaga gggcagatct 650

BglII

651

g

SEQUENCE LISTING

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.
Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> New methods for selecting an immunosuppressive agent having the reduced risk for causing thrombocytopenia as its side effect

<130> PW023998

<150> JP 2002-203901

<151> 2002-07-12

<160> 17

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-1

<400> 1

tcgcttagcct gagtatttaa caatcgacc ct

32

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer- 2

<400> 2

cgaagcttgt ggcaggagtt gaggttactg

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2/11

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-3

<400> 3

cgcttagctgc tcttgtccac cacaatatgc 30

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-4

<400> 4

ataagatctat ccctggctcc cacctcag 28

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-5

<400> 5

ataagctttg gtgggtgcgg agggttcg 28

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer-6

<400> 6

atggtaccac cccagaagat gccaggag 28

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3/11

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PCR primer- 7

<400> 7

atgcttagcgc cctctgagcc tcagttc

28

<210> 8

<211> 731

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (731)

<223> Human interleukin-2 (IL-2) gene 5'-flanking region

<220>

<221> TATA_signal

<222> (652).. (657)

<223>

<220>

<221> misc_feature

<222> (676).. (657)

<223> The putative transcription initiation site of the IL-2 gene promoter

<220>

<221> misc_feature

<222> (1).. (731)

<223> Corresponding to the sequence (689-1416) in the GenBank database (Accession: X00695), except for several variations.

<220>

<221> variation

<222> (38).. (731)

<223> 1 bp insertion

<220>

<221> variation

<222> (196).. (731)

<223> T to A exchange

4/11

<220>
<221> variation
<222> (346)..(731)
<223> T to G exchange

<220>
<221> variation
<222> (577)..(731)
<223> T to A exchange

<220>
<221> variation
<222> (688)..(689)
<223> 2 bp insertion (CT)

<400> 8
ctgagtattt aacaatcgca ccctttaaaa aatgtacaat agacattaag agacttaaac 60
agatataataa tcatttttaaa taaaaatagc gttaaacagt acctcaagct caataaggcat 120
tttaagtattt ctaatcttag tatttctcta gctgacatgt aagaagcaat ctatcttattt 180
gtatgcaattt agtcatttgt gtggataaaa aggtaaaacc attctgaaac aggaaaccaa 240
tacacttcctt gttaatcaa caaatctaaa cattttattct tttcatctgt ttactcttgc 300
tcttgcac cacaatatgc tattcacatg ttcatgttag ttttaggaca aagaaaattt 360
tctgagttac ttttgtatcc ccacccctt aaagaaagga gaaaaactg tttcatacag 420
aaggcgtaa ttgcatgaat tagagctatc acctaagtgt ggctaatgt aacaaagagg 480
gatttcacctt acatccattc agtcagtctt tgggggtta aagaaattcc aaagagtcat 540
cagaagagga aaaatgaagg taatgtttt tcagacaggt aaagtctttg aaaatatgtg 600
taatatgtaa aacatttga cacccctata atattttcc agaattaaca gtataaattt 660
catctcttgtt tcaagagttc cctatcactc tcttaatca ctactcacag taacctcaac 720
tcctgccacaca a 731

<210> 9

5/11

<211> 819
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(819)
<223> Human GATA- 1 gene promoter region

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(819)
<223> Corresponding to the sequence (5342-6160) reported by K. Blechschmidt et al. / GenBank (Accession: AF196971)

<220>
<221> misc_feature
<222> (790)..(819)
<223> The putative transcription initiation site of the GATA-1 gene promoter

<400> 9 atccctggct cccacccat tttcccgctt ccaaggcagc atggcgggca agaagtttag	60
gccactgtcc ctgggtgttc ctaccccccac accctcaccc caagacagcc tgttactgct	120
gccccaaacag ccacggtcgc ctacatctga taagacttat ctgctgcccc agggcaggcc	180
ggagctggcg taagccccag tggggcgcta agtgagtgtg cccctgcctc ccggccagcac	240
tggcctggcc tgcaggctta gcctgggtca tcaaggatcc ccacaggctc tagttcaaat	300
ccagcagaac ctctctgagc ctcacttttc tcacactgaa aatggtaca gccacatccc	360
ttctctccct gcagccagga agacgcacat acacaggagt ctggccaca ccggcccccgc	420
acaaatthaag ggctttactc tctgaaaagc ccagtgaagt catgaaacca tatctgctat	480
tttcattttat cttggtttca gcctattttgc tttgtctggca cactacagtc cacgggagcc	540
taggtcgagc gagggtccaaag aatccccagg gtgggcagg agggtgaaag agggcctcca	600
gtgccccaaaga ggtccccac aagcatggga cccgccccct cccctggact gccccaccca	660
ctggggcacc agccactccc tggggaggag ggaggaggaa gaagggaggaggg agggaggag	720

6/11

ggaggaaggg agcctcaaag gccaaaggcca gccaggacac cccctggat cacaactgago 780
ttgccacatc cccaaaggcgg ccgaaccctc cgcaaccac 819

<210> 10
<211> 637
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(637)
<223> Human GATA-1 gene enhancer region

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(637)
<223> Corresponding to the sequence (2362-2998) reported by K. Blechs
chmidt et al. / GenBank (Accession: AF196971)

<400> 10
accccagaag atgccaggag ggagtgagcc agtcaggaa ggcttccgag aagagaggac 60
attgaagaag agtctcaaac ttaggcctga cggagaagac gcgcggccag gacaccccac 120
ccccggccctc gtctccccca aagcctgatc tggcccaact gattccctta tctgcccact 180
cccaagctgcc tccttgctgg ctgaactgtc gccgcagact tctgagccctg cgccccctcc 240
acggggatgg gggagggaaat ggggtgaggc ctggcctcac agcctcgggg tttccagctc 300
ttgctggagg caggcgtctg gggcgcccta ctccctcaccc ttggcttctc ttccctgagcg 360
ctctgtgtc tccagaaatg aagaaatggg gtgagtcag cggccaaacc ctgttcttag 420
ctcttagaca tgcctcgagc ctgccattcc ctgtgaggac agattccct atgttgcgac 480
cgctgcttct aataataata atgatgatga taattccat ttacagagca caccatttat 540
ggtgtgccag caggccctgt gctgagtggt tcctacccac gtggggggct aggactttac 600
ccgttttcca gatgaagaaa ctgaggctca gagggcgc 637

7/11

<210> 11
<211> 434
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(434)
<223> Human interleukin-2 (IL-2) gene 5'-flanking region

<220>
<221> TATA_signal
<222> (355)..(360)
<223>

<220>
<221> misc_feature
<222> (379)..(360)
<223> The putative transcription initiation site of the IL-2 gene promoter

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(434)
<223> Corresponding to the sequence (+985 to +1416) in the GenBank database (Accession: X00695), except for several variations.

<220>
<221> variation
<222> (49)..(434)
<223> T to G exchange

<220>
<221> variation
<222> (280)..(434)
<223> T to A exchange

<220>
<221> variation
<222> (391)..(392)
<223> 2 bp insertion (CT)

8/11

<400> 11
tgctcttgc caccacaata tgctattcac atgttcagtg tagttttagg acaaagaaaa 60
ttttctgagt tactttgtt tccccacccc cttaaagaaa ggaggaaaaa ctgtttcata 120
cagaaggcgt taattgcattt aatttagagct atcacctaag tgtggctaa tgtaacaaag 180
agggatttca cctacatcca ttcaagtca ctttgggggt ttaaagaaat tccaaagagt 240
catcagaaga ggaaaaatga aggtaatgtt tttcagaca ggtaaagtct ttgaaaatata 300
tgtaatatg taaaacattt tgacacccccc ataatatttt tccagaatta acagtataaa 360
ttgcatctct tttcaagag ttccctatca ctcttttaa tcactactca cagtaacacctc 420
aactcctgcc acaa 434

<210> 12
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CEBP-11, synthetic DNA

<400> 12
cgcgttggc aagactttag caagtacttg agcaaggctt gagcaaggct tgagcaagc 59

<210> 13
<211> 59
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CEBP-12, synthetic DNA

<400> 13
tcgagcttgc tcaaggcttg ctcaacgctt gctcaagtac ttgctcaagt ctgtctcaa 59

<210> 14
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

9/11

<223> HSE-11, synthetic DNA

<400> 14

cgcgtaga atgttctaga tctagaacat tctagctaga atgttctaga c

51

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HSE-12, synthetic DNA

<400> 15

tcgagtctag aacattctag ctagaatgtt ctagatctag aacattctag a

51

<210> 16

<211> 651

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GATA-1 gene HSI region (mutant)

<220>

<221> mutation

<222> (178)..(178)

<223> in vitro mutation (from "a" to "g")

<220>

<221> mutation

<222> (519)..(519)

<223> in vitro mutation (from "t" to "g")

<400> 16

ctacgcgtac cccagaagat gccaggaggg agtgagccag tcagggagg cttccgagaa

60

gagaggacat tgaagaagag tctcaaactt aggccctgacg gagaagacgc gcggccagga

120

caccccaccc cgcgcctcggt ctcccccaaa gcctgatctg gcccactga ttcccttgtc

180

tgcccactcc cagctgcctc cttgctggct gaactgtcg cgcagacttc tgagcctgcg

240

ccccctccac gggatgggg gagggatgg ggtgaggcct ggcctcacag cctcggggtt

300

10/11

tccagcttctt	gctggaggca	gggcctctggg	gcgcctact	cctcaccctt	ggcttcttctt	360
cctgagcgct	ctgtgctctc	cagaaatgaa	gaaatgggt	gagtccagcg	gccaaaccct	420
tgtcttagct	cttagacatg	cctcgagcct	gccattccct	gtgaggacag	attccctat	480
tttgcgacccg	ctgcttctaa	taataataat	gatgatgaga	attcccattt	acagagcaca	540
ccatttatgg	tgtgccagca	ggccctgtgc	tgagtggttc	ctacccacgt	ggggggctag	600
gactttaccc	gttttccaga	tgaagaaact	gaggctcaga	gggcagatct	g	651

<210> 17

<211> 838

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GATA-1 gene IE promoter (mutant)

<220>

<221> mutation

<222> (160)..(160)

<223> in vitro mutation (from "t" to "g")

<220>

<221> mutation

<222> (168)..(168)

<223> in vitro mutation (from "a" to "g")

<220>

<221> mutation

<222> (287)..(287)

<223> in vitro mutation (from "a" to "g")

<220>

<221> mutation

<222> (482)..(482)

<223> in vitro mutation (from "t" to "g")

<220>

<221> mutation

11/11

<222> (498)..(498)
<223> in vitro mutation (from "a" to "g")

<220>
<221> mutation
<222> (798)..(798)
<223> in vitro mutation (from "t" to "g")

<400> 17
atagatctga tccctggctc ccacacctgt ttcccgctc caaggcagca tggcgggcaa 60
gaagttgagg ccactgtccc tgggtgttcc taccccccaca ccctcaccccc aagacagcct 120
gttactgcgg cgccaaacagc cacggtcgccc tacatctgag aagacttgtc tgctgcccc 180
gggcaggccg gagctggcgt aagccccagt ggggcgctaa gtgagtgtgc ccctgcctcc 240
cgccagcact ggcctggcct gcaggcttag cctgggtcat caaggtgtcc cacaggctct 300
agttcaaatac cagcagaacc tctctgagcc tcactcttct caccgtcaaa atgggtacag 360
ccacatccct tctctccctg cagccaggaa gacgcacata cacaggagtc tagcccacac 420
cggcccccgcga caaattaagg gctttactct ctgaaaagcc cagtgaagtc atgaaaccat 480
agctgctatttttgc ttggtttcag cctattttgc ttgtctggac actacagtcc 540
acgggagcct aggtcgagcg aggtccaaga atccccaggg tggcaggga gggtggaaga 600
gggcctccag tgcccaagag gtgcacccaca agcatggac ccgcggccctc ccctggactg 660
ccccacccac tggggcacca gccactccct ggggaggagg gaggaggag aagggaggga 720
gggagggagg gaggaaggga gcctcaaagg ccaaggccag ccaggacacc ccctggatc 780
acactgagct tgccacagcc ccaaggcggc cgaaccctcc gcaaccacca aagcttat 838

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08621

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' C12Q1/02, C12N15/09, A61K45/00, G01N33/53, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12Q1/02, C12N15/09, A61K45/00, G01N33/53, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VIGUSHIN, D.M. et al., Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. <i>Anticancer Drugs</i> , 2002, January, Vol.13, No.1, pages 1 to 13	1-21
A	SHIVDASANI, R.A. et al., A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development., <i>EMBO J.</i> , 1997, Vol.16, No.13, pages 3965 to 3973	1-21
A	WO 00/08048 A1 (Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.), 17 February, 2000 (17.02.00), (Family: none)	1-21

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
22 September, 2003 (22.09.03)Date of mailing of the international search report
07 October, 2003 (07.10.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/08621

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 22-29 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Since no specific substance is presented in the description as an HDAC inhibitor as set forth in claim 22, claim 22 is not fully supported by the description. The same applies to the inventions as set forth in claims 23 to 29.
3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12Q 1/02, C12N 15/09, A61K 45/00, G01N 33/53, G01N 33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12Q 1/02, C12N 15/09, A61K 45/00, G01N 33/53, G01N 33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	VIGUSHIN, D. M. et al. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. Anticancer Drugs 2002. Jan, Vol. 13, No. 1, p. 1-13	1-21
A	SHIVDASANI, R. A. et al. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. EMBO J. 1997, Vol. 16, No. 13, p. 3965-3973	1-21
A	WO 00/08048 A1 (藤沢薬品工業株式会社) 2000. 02. 17 (ファミリーなし)	1-21

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 09. 03

国際調査報告の発送日

07.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B 9281



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 22-29 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
明細書には、請求の範囲22に記載されているHDAC阻害剤として具体的な物が記載されていないので、請求の範囲22は、明細書によって十分に裏付けられていない。請求の範囲23-29に記載されている発明も同様である。
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。